



Title	心不全におけるミトコンドリア機能の心筋治療法の確立に関する研究
Author(s)	前川, 聡
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13466号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13466
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91637
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2480
File Information	Satoshi_Maekawa.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

心不全におけるミトコンドリア機能の

心筋治療法の確立に関する研究

**(Studies on determination of regulatory factor of
mitochondrial function and the development of
new therapy based on the mitochondrial function
in heart failure)**

2019年 3月

北海道大学

前川 聡

学位論文

心不全におけるミトコンドリア機能の

心筋治療法の確立に関する研究

**(Studies on determination of regulatory factor of
mitochondrial function and the development of
new therapy based on the mitochondrial function
in heart failure)**

2019年 3月

北海道大学

前川 聡

2.1.3.6. 心筋ミトコンドリアにおける complex II 発現量と complex II の発現量の相関.....	43
2.1.4. 考察.....	44
2.2. 実験 2 C57BL/6J マウス骨格筋ミトコンドリアにおける complex I, complex II 機能の比較に関する研究.....	45
2.2.1. 緒言.....	45
2.2.2. 方法.....	47
2.2.2.1. ミトコンドリア単離.....	47
2.2.2.2. ミトコンドリア濃度測定.....	47
2.2.2.3. 骨格筋線維組織の細胞膜透過処理.....	47
2.2.2.4. ミトコンドリア呼吸能.....	47
2.2.2.5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法.....	48
2.2.2.6. ブルーネイティブ電気泳動法.....	48
2.2.2.7. 統計学的解析.....	48
2.2.3. 結果.....	49
2.2.3.1. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能の比較.....	49
2.2.3.2. 腓腹筋組織における complex I, complex II 呼吸能の比較.....	51
2.2.3.3. 腓腹筋, ヒラメ筋, 長趾伸筋におけるミトコンドリア当たりの complex I と complex II の呼吸能, 呼吸調節率の比較.....	52
2.2.3.4. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I の発現量と呼吸能の相関.....	54
2.2.3.5. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I サブユニットの発現量と呼吸能の相関.....	55
2.2.3.6. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex I サブユニットの発現量の相関.....	56
2.2.3.7. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II の発現量と呼吸能の相関.....	58
2.2.3.8. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量と呼吸能の相関.....	59
2.2.3.9. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II サブユニットの発現量の相関.....	60
2.2.4. 考察.....	61

第3章 実験3 心筋梗塞後心不全マウスの心筋ミトコンドリア complex II 機能, サブユニット, 会合因子の発現と complex II 会合の経時的変化に関する研究.....	63
3.1. 緒言.....	63
3.2. 方法.....	65
3.2.1. 心不全モデルマウスの作製.....	65
3.2.2. 心エコー.....	66
3.2.3. ミトコンドリア単離.....	67
3.2.4. ミトコンドリアタンパク質濃度測定.....	67
3.2.5. 心筋線維の細胞膜透過性処理.....	67
3.2.6. ミトコンドリア呼吸能.....	67
3.2.7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法.....	67
3.2.8. ブルーネイティブ電気泳動法.....	68
3.2.9. ショ糖密度勾配遠心分離法.....	68
3.2.10. 統計学的解析.....	70
3.3. 結果.....	71
3.3.1. 動物特性, 心エコーデータ.....	71
3.3.2. コントロール群, 心不全群における心筋ミトコンドリア complex II 呼吸能の経時的変化.....	75
3.3.3. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりの complex II 呼吸能の比較 (6 時間後, 28 日後).....	76
3.3.4. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりのミトコンドリア量の比較 1 (6 時間後, 28 日後).....	77
3.3.5. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりのミトコンドリア量の比較 2 (6 時間後, 28 日後).....	78
3.3.6. コントロール群, 心不全群における complex II 発現量の比較.....	79
3.3.7. コントロール群, 心不全群における complex II サブユニット, 会合因子の発現量の比較.....	80
3.3.8. ショ糖密度濃度勾配遠心法によるコントロール群, 心不全群の complex II 発現量の比較.....	85
3.4. 考察.....	90
第4章 実験4 心筋梗塞後早期における心筋ミトコンドリア complex II 機能低下 について.....	92

4.1. 緒言.....	92
4.2. 方法.....	94
4.2.1. 心不全モデルマウスの作製.....	94
4.2.2. 細胞培養.....	94
4.2.3. siRNA.....	94
4.2.4. 細胞からのタンパク質抽出.....	95
4.2.5. 細胞からのミトコンドリア単離.....	95
4.2.6. タンパク質濃度測定.....	95
4.2.7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法.....	96
4.2.8. ブルーネイティブ電気泳動法.....	96
4.2.9. Real time PCR 法.....	96
4.2.10. 低酸素モデル細胞培養 (DFO)	98
4.2.11. 炎症反応亢進マウスの作製.....	98
4.2.12. ミトコンドリア呼吸能.....	98
4.2.13. 統計学的解析.....	99
4.3. 結果.....	100
4.3.1. SDHA 発現量低下が complex II の発現量や機能に及ぼす影響... 100	
4.3.2. コントロール群, 心不全群における細胞当たりの complex II サブユニット, 会合因子の発現量の比較.....	102
4.3.3. コントロール群,心不全群における心筋梗塞早期の SDHAF1 の mRNA レベルの比較.....	103
4.3.4. コントロール群と心不全群における心筋梗塞後早期の炎症反応評価.....	104
4.3.5. 炎症反応が complex II 機能に及ぼす影響.....	105
4.3.6. コントロール群と心不全群における心筋梗塞後早期の低酸素評価.....	106
4.3.7. 低酸素が complex II の発現量, 機能に及ぼす影響.....	107
4.4. 考察.....	112

第5章 心筋梗塞後心不全マウス慢性期の心筋ミトコンドリア complex II 機能低下の原因に関する研究..... 114

5.1. 実験 5 コントロール群, 心不全群における succinyl-CoA 及びミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の比較と complex II 呼吸能との関連.....	114
5.1.1. 緒言.....	114

5.1.2. 方法.....	116
5.1.2.1. 心不全モデルマウスの作製.....	116
5.1.2.2. 質量分析.....	116
5.1.2.3. 組織からのミトコンドリア単離.....	116
5.1.2.4. 細胞からのミトコンドリア単離.....	116
5.1.2.5. ミトコンドリアタンパク質濃度測定.....	116
5.1.2.6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法.....	117
5.1.2.7. ブルーネイティブ電気泳動法.....	117
5.1.2.8. ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化/脱サクシニル化アッセイ濃度測定.....	117
5.1.2.9. β -OHB 測定.....	118
5.1.2.10. ミトコンドリアヘムの測定.....	118
5.1.2.11. ミトコンドリア呼吸能.....	119
5.1.2.12. 免疫沈降.....	119
5.1.2.13. 統計学的解析.....	119
5.1.3. 結果.....	121
5.1.3.1. コントロール群, 心不全群における心筋の succinate, α ケトグルタル酸, サクシニル CoA 量の比較.....	121
5.1.3.2. コントロール群, 心不全群におけるサクシニル CoA 合成酵素発現量の比較.....	122
5.1.3.3. コントロール群, 心不全群におけるケトン代謝の比較.....	123
5.1.3.4. コントロール群, 心不全群におけるヘム合成の比較.....	124
5.1.3.5. サクシニル CoA 量がミトコンドリアタンパク質のサクシニル化や complex II の機能に与える影響.....	125
5.1.3.6. コントロール群, 心不全群におけるサクシニル化と complex II 機能の比較.....	126
5.1.3.7. Complex II 機能不全によるサクシニル化の変化.....	127
5.1.3.8. コントロール群, 心不全群における complex II の発現量の比較.....	128
5.1.3.9. コントロール群, 心不全群における complex I, IV の機能の比較.....	129
5.1.3.10. サクシニル化の低下が complex II 機能に与える影響.....	130
5.1.3.11. Complex II のサクシニル化部位の評価.....	135
5.1.3.12. コントロール群, 心不全群における SDHA, SDHB のサクシニル化.....	135

ル化の比較.....	136
5.1.4. 考察.....	137
5.2. 実験6 コントロール群, 心不全群におけるカルジオリピンの比較と complex II 呼吸能との関連.....	141
5.2.1. 緒言.....	141
5.2.2. 方法.....	143
5.2.2.1. 心不全モデルマウスの作製.....	143
5.2.2.2. 組織からのミトコンドリア単離.....	143
5.2.2.3. ミトコンドリアタンパク質濃度測定.....	143
5.2.2.4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法.....	143
5.2.2.5. カルジオリピン解析.....	143
5.2.2.6. 統計学的解析.....	143
5.2.3. 結果.....	144
5.2.3.1. コントロール群, 心不全群における心筋ミトコンドリア当たりのリン脂質の比較.....	144
5.2.3.2. コントロール群, 心不全群における CRLS1, PLD6 の発現量の比較.....	145
5.2.4. 考察.....	147
第6章 総括及び結論.....	148
謝辞.....	149
利益相反.....	150
引用文献.....	151

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

- 1) Satoshi Maekawa, Shingo Takada*, Shintaro Kinugawa, Takaaki Furihata, Hideo Nambu, Naoya Kakutani, Junichi Matsumoto, Masaya Tsuda, Ryosuke Shirakawa, Takashi Katayama, Takayuki Nakajima, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai. Mitochondrial Respiration of Complex II Was Not Lower than that of Complex I in Mouse Skeletal Muscle. *Frontiers in physiology*.

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表した。

- 1) Satoshi Maekawa, Takaaki Furihata, Shingo Takada, Wataru Mizushima, Arata Fukushima, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa. mitoNEET Regulates Mitochondrial Iron Contents in the Hearts. The 33rd Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. December 16, 2016, Tokyo, Japan.
- 2) Satoshi Maekawa, Shingo Takada, Shintaro Kinugawa, Takaaki Furihata, Hideo Nambu, Naoya Kakutani, Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai. Complex II-linked respiration is comparable to complex I-linked respiration in mouse heart. Cell symposia. Multifaceted Mitochondria. June 4, 2018, San Diego, USA.
- 3) Satoshi Maekawa, Shingo Takada, Shintaro Kinugawa, Takaaki Furihata, Hideo Nambu, Naoya Kakutani, Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai. 心不全の発症，進展におけるミトコンドリア complex II. 第28回 北海道カルディアックセミナー，2018年7月7日，札幌.
- 4) Satoshi Maekawa, Shingo Takada, Hideo Nambu, Naoya Kakutani, Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Ippei Nakano, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai. Role of mitochondrial complex II respiration and assembly in heart failure after myocardial infarction. 第5回 iHF フォーラム，2018年8月4日，大阪.
- 5) Satoshi Maekawa, Shingo Takada, Shintaro Kinugawa, Hideo Nambu, Naoya Kakutani,

Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai. The supplementation of succinyl-CoA improves the lowered mitochondrial complex II function 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018年9月22日, 奈良.

- 6) Satoshi Maekawa, Shingo Takada, Shintaro Kinugawa, Hideo Nambu, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai. 慢性心不全におけるミトコンドリア複合体II機能制御機構の解明 第6回 Heart Science Club, 2018年12月1日, 東京. 奨励賞受賞.

要旨

【背景と目的】

人口の高齢化，生活習慣病に伴う冠動脈疾患の増加等に伴い，我が国の心不全患者は増加しており，今後もさらに増加すると予測されている．心不全に対する薬物治療や非薬物治療が普及してきたものの，死亡率のみならず再入院率の高さが依然として臨床的課題であり，効果的な治療法の確立が求められている．心不全の発症や進展に関わる因子として心室リモデリングが知られており，心室リモデリングを抑制することで心不全の発症を予防できることが報告されている．近年の研究から，心室リモデリングの進行に心筋ミトコンドリアの機能不全が関与すると考えられている．ミトコンドリアはエネルギー産生の中心的役割を担い，心臓や骨格筋のようなエネルギー需要の高い臓器ではその役割は特に重要である．ミトコンドリア内膜上には電子伝達系を構成するタンパク質複合体である complex I, II, III, IV が存在し，これらの複合体により内膜内外にプロトンの濃度勾配が作られ，この濃度勾配を利用して complex V により ATP が産生される．この反応を酸化リン酸化と呼ぶ．電子伝達系のうち，complex I, III, IV はさらなる複合体である supercomplexes (SCs, 超複合体) を構成し，効率的な電子伝達を行えると考えられている．Complex I は心不全の心筋ミトコンドリアにおいてこれまでに数多く研究され，心不全でその機能が低下することが報告されている．一方，complex II は SCs には含まれておらず，complex II に関する研究は complex I と比較して少ない．SCs は効率的に ATP 産生されると考えられているが，SCs に含まれている complex I と，SCs に含まれていない complex II がミトコンドリアの ATP 産生にそれぞれの程度貢献しているかという観点で両者の機能を比較した研究はこれまでにない．

これらのことから我々は complex II の機能に着目し，心筋，骨格筋ミトコンドリアにおいて complex I の機能と比較すること，心不全における心筋ミトコンドリア機能低下のメカニズムを明らかにすること，心不全のミトコンドリア機能低下に対する治療法を開発することを目的とした．

【材料と方法】

C57BL/6J マウスの心筋や骨格筋と，培養細胞 (H9c2 細胞, C2C12 細胞) から単離したミトコンドリアの呼吸能を OROBOROS 社製の Oxygraph-2k を使用して測定した．

心不全モデルとして C57BL/6J マウスに心筋梗塞を作製し，偽手術をしたマウスをコントロール群とした．エコーにより心機能や心室内腔，壁厚を計測した．

組織や細胞から単離したミトコンドリアや whole cell lysate におけるタンパク質発現量をブルーネイティブ電気泳動法やポリアクリルアミドゲル電気泳動法によ

り評価した。また、RNA を抽出し、PCR 法により mRNA レベルの発現量を評価した。

【結果】

C57BL/6J マウスの心筋、骨格筋から単離したミトコンドリアで測定した complex II 呼吸能は complex I 呼吸能に匹敵した。Complex II 呼吸能は複合体としての complex II の発現量と有意に相関したのに対して、complex II サブユニットの発現量とは相関しなかった。

心不全群の心筋ミトコンドリアの complex II 呼吸能は、コントロール群と比較して心筋梗塞後早期（6 時間後）、慢性期（28 日後）ともに有意に低下した

心筋梗塞後早期は、ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量が心不全群で低下し、complex II 発現量も低下した。

慢性期は、心不全群のミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量はコントロール群と差はなかった。心不全群では心筋組織当たりのサクシニル CoA が減少し、ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下した。心不全群では心筋でのケトン代謝、ヘム合成が亢進した。心不全群の心筋ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えると complex II 呼吸能は改善した。培養液にグリシンを添加して培養した H9c2 細胞はミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下し、complex II 呼吸能が低下した。このミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化が増加し、complex II 呼吸能は改善した。

【考察】

C57BL/6J マウスの心筋、骨格筋から単離したミトコンドリアの complex II 呼吸能が complex I 呼吸能に匹敵したことから、ミトコンドリアの ATP 産生において complex II は complex I と同等に重要な役割を果たしていることが示唆された。Complex II 呼吸能は complex II の発現量と有意に相関したのに対して、complex II サブユニットの発現量とは相関しなかったことから、complex II が機能するために complex II 複合体を形成することが重要であること、complex II サブユニットの一部は complex II の機能に直接関与していないことが示唆された。

心不全群の心筋ミトコンドリアの complex II 呼吸能は、心筋梗塞後早期（6 時間後）、慢性期（28 日後）いずれもコントロール群と比較して有意に低下したが、低下した原因は時期によって異なっていた。

心筋梗塞後早期は、ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量が心不全群で低下しており、これが complex II 発現量の低下、complex II 呼吸能の低下の一因と考えられた。

慢性期は、心不全群のミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合

因子の発現量はコントロール群と同等まで改善しており，早期とは異なる要因があることが考えられた．心不全群では心筋におけるケトン代謝やヘム合成が亢進しサクシニル CoA が消費され，心筋組織当たりのサクシニル CoA が減少した．その結果，ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下した．培養液にグリシンを添加して培養した H9c2 細胞はミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下し，complex II 呼吸能が低下した．このミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化が増加し，complex II 呼吸能は改善したことからミトコンドリアタンパク質のサクシニル化低下が complex II 呼吸能低下の原因と考えられた．実際，心不全群のミトコンドリアにサクシニル CoA を添加してミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が増加し，complex II 呼吸能は改善した．サクシニル化の標的タンパク質は本研究では明らかにならなかったが，complex I や complex IV の呼吸能はサクシニル CoA の添加によって変化しなかったことから complex II がサクシニル化の標的であることが示唆された．

【結論】

マウスの心筋，骨格筋ミトコンドリアの ATP 産生において complex II は complex I と同等に重要であることが示唆された．

心不全マウスの心筋ミトコンドリア complex II 呼吸能は早期，慢性期ともにコントロール群と比較して低下したが，低下した原因は異なっていた．早期には，ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量の低下が複合体としての complex II 発現量低下を招き，その結果 complex II 呼吸能が低下した．慢性期には，ヘム合成やケトン代謝の亢進によりサクシニル CoA が消費されて減少し，ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下した．サクシニル化の低下により complex II 呼吸能は低下し，サクシニル CoA をミトコンドリアに添加することでミトコンドリアタンパク質のサクシニル化，complex II 呼吸能は改善した．

略語表

ADP: adenosine diphosphate; アデノシン二リン酸

ALAS: 5-aminolevulinate synthase; 5-アミノレブリン酸合成酵素

ATP: adenosine triphosphate; アデノシン三リン酸

BCA: bicinchoninic acid; ビシンコニン酸

BN-PAGE: blue native polyacrylamide gel electrophoresis; ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動

β -OHB: β -hydroxybutyrate; ベータヒドロキシ酪酸

BSA: bovine serum albumin; 牛血清アルブミン

BW: Body weigh; 体重

CBB: Coomassie Brilliant Blue; クマシーブリリアントブルー

CL: Cardiolipin; カルジオリピン

Complex I: Mitochondrial respiratory chain complex 1; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I

Complex II: Mitochondrial respiratory chain complex 2; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II

COX IV: Cytochrome c oxidase IV; シトクロム c オキシダーゼ複合体 IV

dd H₂O: deionized-distilled hydrogen oxide; 脱イオン水

DNA: Deoxyribonucleic acid; デオキシリボ核酸

EDD: end-diastolic diameter; 拡張末期径

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; エチレンジアミン四酢酸

EGTA: Ethylene glycol bis (beta-aminoethyl ether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid; グリコールエーテルジアミン四酢酸

ETC: electron transfer chain; 電子伝達系

ETS: electron transfer system; 電子伝達系

FAD: flavin adenine dinucleotide; フラビンアデニンジヌクレオチド

FCCP: carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素

H₂O: Hydrogen oxide; 水

HCl: Hydrochloride; 塩酸

IMM: inner mitochondrial membrane; ミトコンドリア内膜

LC/MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; 液体クロマトグラフィー質量分析法

LV: left ventricle: 左室

LVAWT: left ventricular anterior wall thickness: 左室前壁厚

LVDd: left ventricular diastolic diameter: 左室拡張期径

LVDs: left ventricular systolic diameter: 左室収縮期径

LVEDD: left ventricular endo-diastolic diameter: 左室拡張末期径

LVESD: left ventricular endo-systolic diameter: 左室収縮末期径

LVPWT: left ventricular posterior wall thickness: 左室後壁厚

MI: myocardial infarction: 心筋梗塞

MIM: mitochondrial isolation medium; ミトコンドリア単離用メディウム

OXCT-1: 3-oxoacid-CoA-transferase; 3 ケト酸コエンザイム A トランスフェラーゼ

OXPHOS: oxidative-phosphorylation; 酸化的リン酸化

PA: phosphatidic acid; ホスファチジル酸

PBS: Phosphate buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水

PDVF: Polyvinylidene difluoride; ポリフッ化ビニリデン

PE: phosphatidylethanolamine; ホスファチジルエタノールアミン

PGP: phosphatidylglycerol phosphate; ホスファチジルグリセロン酸

PG: phosphatidylglycerol; ホスファチジルグリセロール

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride; フッ化フェニルメチルスルホニル

PS: phosphatidylserine; ホスファチジルセリン

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay; 放射性免疫沈降アッセイ

RCR: Respiratory control ratio; 呼吸調節率

ROS: Reactive oxygen species; 活性酸素種

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

SCs: Supercomplexes; 超複合体

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis; ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDH: succinate dehydrogenase: コハク酸脱水素酵素

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis; ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SUCLA: succinate-CoA ligase ADP-forming: サクシニル CoA 合成酵素 ADP フォーム

SUCLG: succinate-CoA ligase GDP-forming: サクシニル CoA 合成酵素 GDP フォーム

TBS: Tris buffered saline; トリス緩衝生理食塩水

TBST: Tris buffered saline with Tween 20; Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水

TCA: Tricarboxylic acid cycle; クエン酸回路

TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子 α

TMPD: N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine; N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミン二塩酸

VDAC: Voltage-dependent anion channel; 電位依存性陰イオンチャネル

第1章 序論

1.1. 本研究の背景

生活習慣の欧米化に伴う虚血性心疾患の増加，高齢化に伴う高血圧や弁膜症患者の増加により，わが国の心不全患者は増加している(Okura et al., 2008). エビデンスに基づいた標準的薬物治療が普及してきたことに加えて，植込み型除細動器 (ICD, Implantable Cardioverter Defibrillator) や心臓再同期療法 (CRT, Cardiac Resynchronization Therapy) などの非薬物治療が確立し始めたことで，心不全患者の生命予後が改善している(Bristow et al., 2004)ことも，心不全患者数増加の一因となっていると考えられる. わが国では，人口減少と65歳以上の老年人口割合の急増が予測されているなか，2030年に心不全患者は130万人に達すると推計されている(Okura et al., 2008). このような背景から，心不全患者の増加は，臨床上的の問題に加えて社会における医療負担や医療経済も含んだ問題として捉える必要があり，効果的・効率的治療法の確立が求められている.

心臓は収縮と拡張を繰り返しながら全身に血液を送るポンプであり，このポンプが十分に働かない結果体に不具合を生じた状態を心不全という. 近年，日本循環器学会により，「心不全とは心臓が悪いために，息切れやむくみが起こり，だんだん悪くなり生命を縮める病気」と定義された. 心臓が悪くなる原因としては，高血圧，心筋症，心筋梗塞，弁膜症，不整脈等がある. 心不全は発症後の適切な治療によって一時的に症状は改善するが，心不全そのものが完全に治ることはなく，過労，塩分や水分のとりすぎ，感染症，ストレスや薬の飲み忘れなどにより心不全の症状が悪化，あるいは再発する. 安静，治療の適切化等によって心不全の症状は再度改善するがこのような悪化と改善を繰り返しながら心不全は進行して行き，「だんだん悪くなる」. 心不全の生命予後は良くなっているとは言え，悪性疾患と心不全の5年生存率を比較した研究によると心不全は肺がんや大腸がんなどの悪性腫瘍と匹敵して予後不良な疾患である(Stewart et al., 2001).

心不全の原因の1つである急性心筋梗塞とは，冠動脈内に血栓が形成され急激に閉塞した結果，心筋に血液が送られなくなり心筋が壊死に陥る状態である. 一般的には心筋の梗塞サイズが大きいほど急性心筋梗塞は重症になる. カテーテル治療などの急性期治療により急性期を乗り切ったとしても，左室リモデリングを生じ，これが心不全の発症や進展の要因であると考えられている.

左室リモデリングとは，心臓が血行力学的負荷に対応して循環動態を一定に保つために構造や形態を変化させることであり，心筋梗塞後や慢性圧・容量負荷後などにみられる. 心筋梗塞後には梗塞部の壁運動が低下し，非梗塞部のみの壁運動では必要な心拍出量が得られなくなるため，代償機転として Frank-Starling 機序により左

室容積が増大する。この容量負荷に基づく左室壁応力上昇に対する代償として残存心筋の肥大が生じる。一方、高血圧による圧負荷が心臓に加わると、心筋は代償性に肥大し心機能を維持しようとする。過剰な圧負荷がさらに持続すると、心筋細胞は伸展し心腔は拡大する。このような心室リモデリングは生体の代償機転であるが、その促進は長期的にみると予後不良因子となることがアンジオテンシン変換酵素 (ACE, angiotensin converting enzyme) 阻害薬の長期投与効果を検討した大規模試験で明らかとなっている(Pfeffer et al., 1992)。SAVE 試験では、ACE 阻害薬は心室リモデリングを抑制し心不全の発症を予防した。心室リモデリングは組織学的には心筋細胞の肥大と間質の線維化を伴っており、心室リモデリングには、アンジオテンシン II やエンドセリン、カテコラミンなどの神経体液性因子が関与すると考えられている(Kodama et al., 2004)。また、近年、心室リモデリングの進行にミトコンドリア機能不全が関与することが報告された(Tsuburaya, 2017)。

ミトコンドリアは ATP 産生の中心的役割を果たしており、ATP は主に酸化リン酸化により産生される。酸化リン酸化は内膜上の 5 つのタンパク質複合体によって担われている (図 1-1)。5 つの複合体は、complex I : NADH-ユビキノン還元酵素, complex II : コハク酸脱水素酵素, complex III : ユビキノール-シトクロム c 還元酵素, complex IV : シトクロム c 酸化酵素, complex V : ATP 合成酵素である。これらの複合体が、NADH や FADH₂ から得られた電子を complex I-III-IV, complex II-III-IV の順に伝達する間にミトコンドリア内膜の内外にプロトンの濃度勾配がつけられ、この濃度勾配を利用して complex V により ADP から ATP が産生される (Dudkina et al., 2010; Ricci et al., 2004; Vartak et al., 2013)。

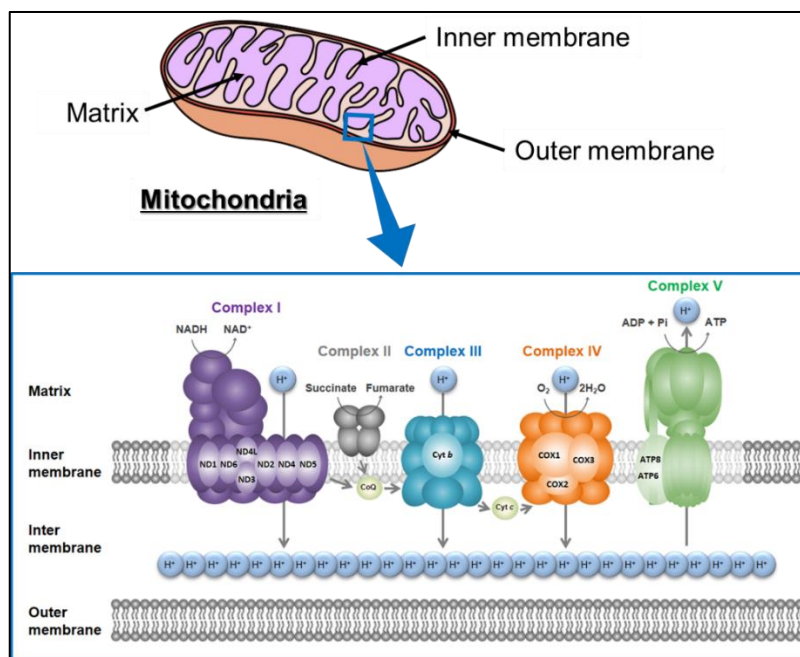


図 1-1. ミトコンドリア内膜上の酸化的リン酸化の模式図

電子を効率よく伝達するために, complex I, III, IV はさらなる複合体である超複合体 (supercomplexes, SCs) を形成する. この SCs は真菌, 植物, マウス, ヒトまで広く保存されており, 重要な複合体であると考えられている (Dudkina, et al. 2005; Rosca, et al. 2008; Takada, et al. 2016). 電子伝達系を構成する複合体のうち, complex II は SCs に含まれていないと報告されている (Dudkina et al., 2008; Gomez et al., 2009).

ミトコンドリアの機能は, これまでは凍結サンプルを用いて各複合体の活性を測定することで評価することが多かったが (Marin-Garcia et al., 2009; Scheubel et al., 2002), 近年は生きた組織を用いてより生体に近い状態のまま測定することが可能になった (Stride et al., 2013). すなわち, それぞれの複合体単独の活性ではなく, 各複合体間の電子伝達等の相互作用も含めた電子伝達系全体としての機能を測定できる. 具体的にはミトコンドリアの酸素消費量 (呼吸能) を Oxygraph-2k という測定機器を使用して生きた組織でリアルタイムかつ高感度に測定する (Hutter et al., 2006). ミトコンドリアの ATP 産生能はミトコンドリア呼吸能と強く正の相関関係を示すことが報告されており (Lark et al., 2016), ミトコンドリアの酸素消費量を測定することで間接的にはあるが ATP 産生能を測定することができる. 我々も酸素消費量を指標として基質や阻害剤をプロトコルに沿って順番に入れていくことで, 一度の測定でミトコンドリアの各 state での評価, および呼吸鎖の中の各複合体に関連した解析を行えることを報告してきた (Takada et al., 2016; Tsuda et al., 2018).

心臓はポンプとして絶え間なく機能するために多くのエネルギーを必要とする臓器である. 具体的には, ヒトは 1 日当たり大まかに体重ほど (約 65 kg) の ATP を産生, 消費している. 心臓の重量は体重のわずか 0.5% 程度だが, ATP 消費量は約 8% を占める. このエネルギー需要に対応するため, 心筋細胞はその 25-30% がミトコンドリアであり, 心臓はミトコンドリアを豊富に含む臓器である (Bayeva et al., 2013). ミトコンドリアはエネルギー産生を介して心機能の維持に重要な役割を担っており, ミトコンドリアの機能不全が心筋の機能不全, 心室リモデリングの進行, 心不全の増悪に関与することが報告されている (Marin-Garcia and Goldenthal, 2008; Tsuburaya, 2017).

心不全におけるミトコンドリア機能不全はこれまでに数多く報告されている. これらの研究の多くは心筋ミトコンドリアの complex I の機能に着目しており, リンゴ酸とグルタミン酸を加えた時の complex I の呼吸能がラット (Garnier et al., 2003), 犬 (Sharov et al., 1998) などの動物モデルで低下しており, ヒトの研究では拡張型心筋症, 高血圧性心不全, 虚血性心不全で低下していることが報告されている (Rosca and Hoppel, 2009; Sanbe et al., 1993; Sharov et al., 2000). Complex II に関する研究はこれま

でほとんど行われてこなかったが，近年 Stride らによってヒトの心不全において心筋ミトコンドリアの complex II の機能が低下していることが報告された(Stride et al., 2013). しかし，complex II 機能低下のメカニズムは明らかではない.

心臓においてミトコンドリアの果たす役割は重要であり，心不全の発症や進行にミトコンドリアの機能不全が関与することからミトコンドリア機能不全は心不全における治療ターゲットになり得ると考えられる. そこで我々は，心不全におけるミトコンドリア機能不全，特に complex II の機能不全のメカニズムを明らかにし新たな治療法を開発することを目的とした.

1.2. 本研究の目的

本研究の目的は心不全に対する新たな治療法の開発である。

心不全において心筋ミトコンドリア機能が低下していること、心不全の進行にミトコンドリア機能不全が関与することが報告されており (Marin-Garcia and Goldenthal, 2008; Tsuburaya, 2017), ミトコンドリア機能低下が心不全の治療ターゲットになり得ると考えた。ミトコンドリア機能の中でも特に **complex II** の機能について詳細に評価し、機能低下の機序を解明し、それに対する治療法を開発することを目的とした。

まず、**complex II** の機能がミトコンドリアの ATP 産生にとってどの程度重要であるかを評価した (第 2 章)。ミトコンドリアの電子伝達系における電子伝達は **complex I-III-IV**, **complex II-III-IV** の 2 通りあり、SCs を構成する **complex I-III-IV** の方が電子伝達は効率的に行えるであろうことから、これまでミトコンドリア機能を評価する際には **complex I** に着目した研究が多かった。しかし、これまでに **complex I** と **complex II** の呼吸能の比率がどの程度であるのかを具体的に示した報告はない。そこで我々は、C57BL/6J マウスの心筋、骨格筋のミトコンドリアにおいて **complex I** と **complex II** の呼吸能を測定し比較した。

次に、心不全における **complex II** 機能評価、治療法の開発を試みた。心不全においてミトコンドリアの **complex II** 機能が低下することは報告されている (Stride et al., 2013) が、その機序の解明や治療法の開発は進んでいないため、心不全における心筋ミトコンドリア **complex II** 機能低下の原因を明らかにすることを目的とした

(第 3 章)。原因を明らかにするために、マウスの心筋梗塞後心不全モデルを使用し、まずは時系列での評価を行い、いつから低下するのかを明らかにした。その上で、その低下の原因を明らかにするとともに治療法を考案した (第 3 章~5 章)。

1.3. 本研究の概論

本研究は6つの基礎研究から構成された。実験1, 2の概要を図1-2に, 実験3-6の概要を図1-3に示した。

心不全の心筋ミトコンドリア機能は低下しており, この機能低下が左室リモデリングの進行や心不全増悪と関連することが報告されている(Tsuburaya, 2017)。この点に介入することで心不全の予後を改善できる可能性が高いと言える。上述したように, ミトコンドリアのATP産生は酸化的リン酸化によるところが大きく, complex Iとcomplex IIを介した経路がある。Complex IがSCsに含まれるのに対してcomplex IIはSCsには含まれないことは報告されているが, complex Iとcomplex IIがそれぞれミトコンドリアにおけるATP産生にどの程度関与しているか明らかではない。そこで, C57BL/6Jマウスの心筋(実験1)と骨格筋(実験2)においてcomplex Iとcomplex IIの機能を比較した。

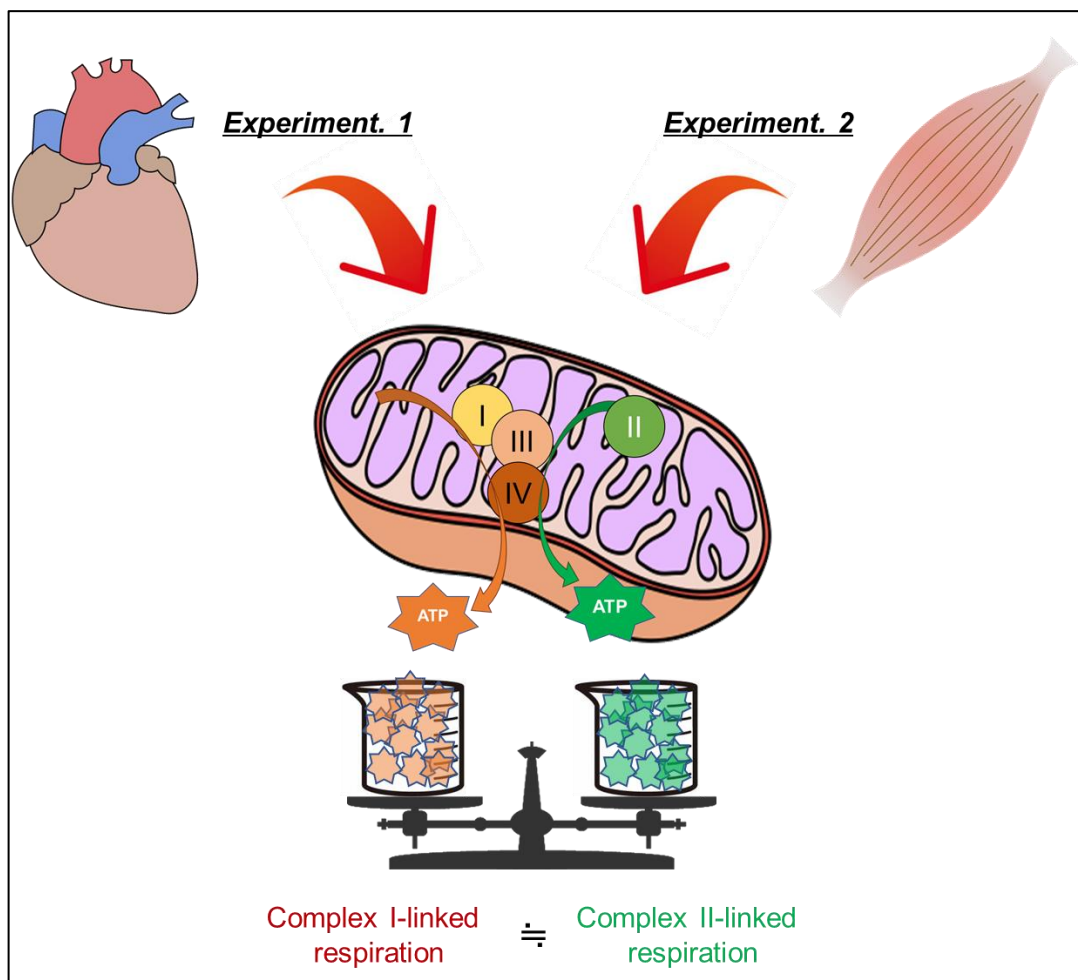


図1-2. 本研究の実験1, 2の概要

心不全の心筋ミトコンドリアで **complex II** の機能が低下することは報告されている(Stride et al., 2013)ものの、その機序は明らかでなく治療法は皆無である。機序を明らかにするために、実験 3 では心筋梗塞後心不全マウスを用いて **complex II** 機能の経時的な変化を詳細に評価した。心筋梗塞の影響が比較的大きいと思われる心筋梗塞早期を **acute phase** とし、臓器重量などの評価やエコー所見から心不全の発症、心室リモデリングの進行を確認した慢性期を **chronic phase** とした。実験 4 では **acute phase**、実験 5、6 では **chronic phase** における **complex II** 機能低下の原因をそれぞれ探索した。

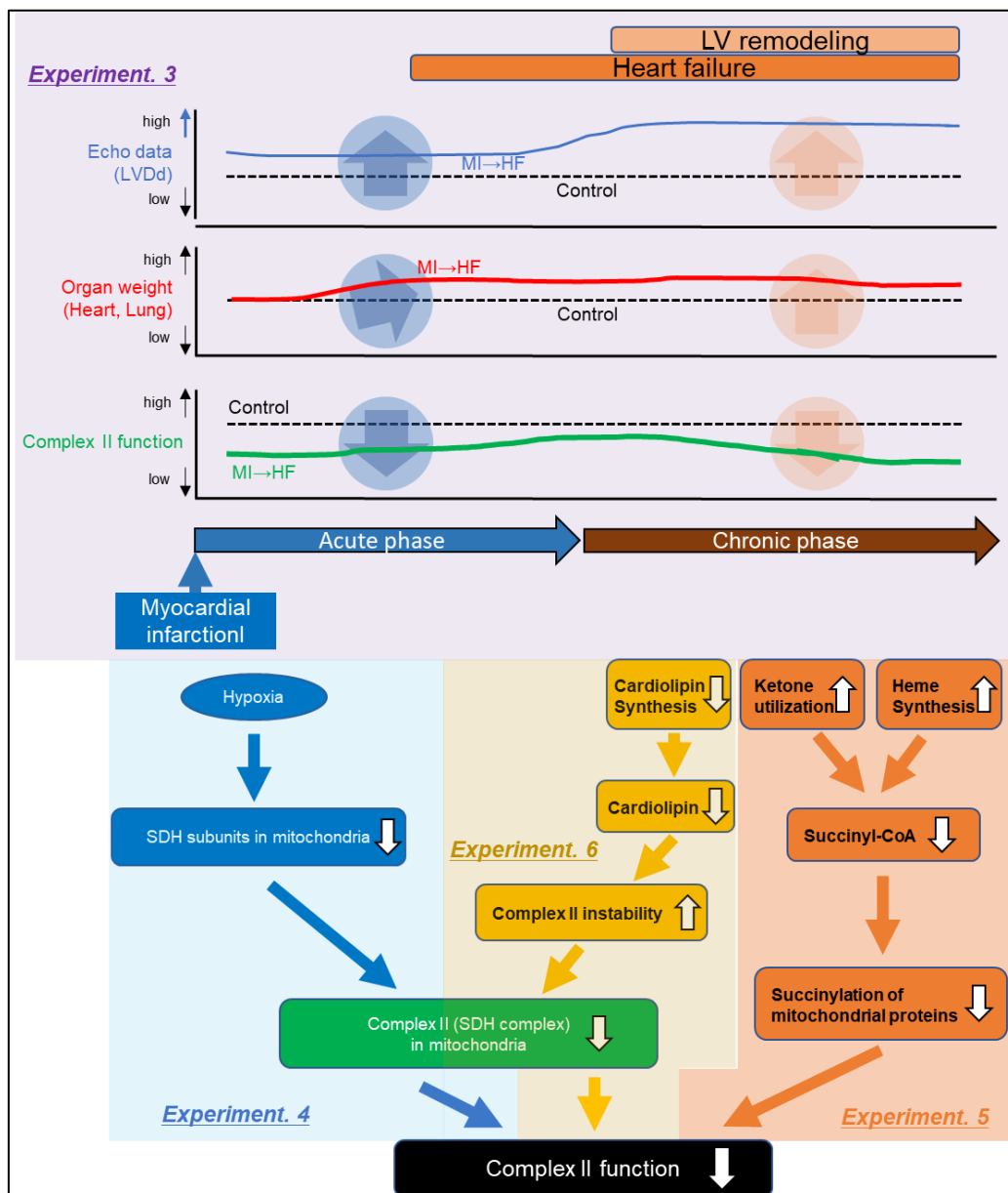


図 1-3. 本研究の実験 3-6 の概要

1.4. 実験材料および実験器具

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調整法，実験器具を示した．

<1> 実験動物

マウス（C57BL/6J）はホクドー株式会社から購入した．

全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守して実施した．

<2> 培養細胞

C2C12 細胞（ATCC® CRL-1772™, Manassas, USA）

H9c2 細胞（ATCC® CRL-1772™, Manassas, USA）

<3> 装置

汎用装置：

- ・超純水製造装置：Milli-Q® Advantage A 10 systeme（Millipore, Billerica, Massachusetts, USA）
- ・卓上型 pH メーター：LAQUA F-71（Horiba Ltd., Kyoto, Japan）
- ・オートクレーブ装置：LSX-300（Tomy Digital Biology Co., Ltd., Tokyo, Japan）
- ・定温恒温乾燥機：NOD-700（Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan）
- ・ラボシェーカー：BC-740（Bio Craft, Tokyo, Japan）
- ・マイクロプレート：CELLSTAR 96 穴マイクロプレート（Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria）
- ・マイクロプレートリーダー：Multiskan™ GO マイクロプレートスペクトロフォトメータ（Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA）
- ・ボルテックスミキサー：VORTEX-GENIE 2 Mixer（Scientific Industries, Bohemia, New York, USA）
- ・分析用電子天びん：BM-252（A&D Company Ltd., Tokyo, Japan）

RT-PCR：

- ・自動核酸抽出システム：QuickGene-800（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）
- ・超微量分光光度計：NanoDrop ND-1000（Thermo Fisher Scientific）
- ・iCycler™ Thermal Cycler（170-8720JA, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA）
- ・Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system（Thermo Fisher Scientific）

細胞培養：

- ・細胞培養フラスコ：CELLSTAR[®] 658175 (Greiner Bio-One)
- ・CO₂ インキュベーター：SCA-165DS (ASTECC, Fukuoka, Japan)
- ・バイオクリーンベンチ：PCV-1605BRG3 (Hitachi, Japan)
- ・遠心式限外ろ過フィルターユニット：Amicon Ultra (Millipore)

心筋梗塞 (MI, myocardial infarction) 手術：

- ・光源装置：LG-PS2 (Olympus)
- ・従量式実験動物人工呼吸器：SN-480-7x2T (Shinano, Tokyo, Japan)
- ・4-0 シルク縫合糸：Sof silk[™] VS-709 (Covidien, Dublin, Ireland)
- ・8-0 シルク縫合糸：ELP M6-80B2 (Akiyama-seisakusyo. Co., Ltd., Tokyo, Japan)

ウェスタンブロット法：

- ・ポリトロンホモジナイザー：Ultra Turrax[®] T25 basic (IKA Works, Staufen, Germany)
- ・ヒートブロック：MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO.,LTD, Tokyo, Japan)
- ・電気泳動槽：Criterion セル (Bio-Rad Laboratories)
- ・Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories)
- ・パワーサプライ：パワーパック 300 (Bio-Rad Laboratories)
- ・PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜：Trans-Blot Turbo[™] PVDF 転写パック (Bio-Rad Laboratories)
- ・タンク式ブロッキング装置：Criterion[™] ブロッター (1704070JA, Bio-Rad Laboratories)
- ・イメージングシステム：ChemiDoc XRS+ System (1708265J1NPC, Bio-Rad Laboratories)

遠心器：

- ・卓上型微量高速遠心器：Minispin (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- ・微量高速冷却遠心器：MX-307 (Tomy Digital Biology Co., Ltd.)
- ・ユニバーサル冷却遠心器：5911 (Kubota Corporation, Tokyo, Japan)
- ・フロア型超遠心器：Optima XE-90 (BECKMAN, Brea, USA)

顕微鏡：

- ・実体顕微鏡：SZ61 (Olympus, Tokyo, Japan)
- ・蛍光顕微鏡：BZ-X700 (Keyence, Tokyo, Japan)

BN-PAGE：

- ・ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) 泳動槽：
XCell Sure Lock™ ミニセル電気泳動システム (EI0001, Thermo Fisher Scientific)
- ・NativePAGE™ 4-16% Bis-Tris Protein Gels (BN1002BOX, Thermo Fisher Scientific)

質量分析

- ・MultiBeads Shocker：Bio Medical Science, Japan
- ・BIORUPTOR：Cosmo Bio Co., Ltd, Japan
- ・ACQUITY BEH C18 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)：Waters, Milford, USA
- ・LCMS 8040 instrument：Shimadzu, Japan
- ・LabSolutions software：Shimadzu, Japan
- ・Nexera X2：Shimadzu, Japan
- ・Q-Exactive mass spectrometer：Thermo Fischer scientific, USA
- ・Accucore C18 column (150×2.1 mm, 2.6 μm), Thermo fisher scientific, USA

その他：

- ・超音波診断装置：Aplio 300 (Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan)
- ・高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置：Oxygraph-2k (O2k) (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria)
- ・ポッター型ホモジナイザー (10 ml) (Wheaton, Boston, USA)
- ・テフロン製ペストル (Wheaton, Boston, USA)
- ・ダウンス型ホモジナイザー (7 ml) (Kimble chase, Mexico)
- ・ガラス製ペストル (Kimble chase, Mexico)

<4> 抗体

- ウサギ抗 GAPDH モノクローナル抗体 (HRP Conjugate) (1:5000, #3683, CST)
- ウサギ抗 SDH5 ポリクローナル抗体 (1:1,000, #14445, CST)
- ウサギ抗 VDAC ポリクローナル抗体 (1:1,000, #4866, CST)
- ウサギ抗 SIRT5 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab13697, Abcam)
- マウス抗 MTCO1 モノクローナル抗体 (1:1,000, ab14705, Abcam)
- マウス抗 SDHA モノクローナル抗体 (1:1,000, ab14715, Abcam)

ウサギ抗 COX IV ポリクローナル抗体 (1:2,000, ab16056, Abcam)
ウサギ抗 ALAS1 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab84962, Abcam)
ウサギ抗 Hsp60 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab46798, Abcam)
ウサギ抗 Aconitase2 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab71440, Abcam)
ウサギ抗 OXCT1 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab105320, Abcam)
マウス抗 Complex II モノクローナル抗体 (1:1,000, ab109865, Abcam)
マウス抗 GRIM19 モノクローナル抗体 (1:1,000, ab110240, Abcam)
マウス Total OXPHOS Blue Native WB 抗体 (1:1,000, ab110412, Abcam)
ウサギ抗 SDHC モノクローナル抗体 (1:1,000, ab155999, Abcam)
ウサギ抗 CRLS1 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab156882, Abcam)
ウサギ抗 SDHB モノクローナル抗体 (1:1,000, ab178423, Abcam)
ウサギ抗 SDHAF1 モノクローナル抗体 (1:1,000, ab185222, Abcam)
ウサギ抗 TOMM20 モノクローナル抗体 (1:1,000, ab186734, Abcam)
ウサギ抗 SDHD ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab189945, Abcam)
ウサギ抗 ACN9 ポリクローナル抗体 (1:200, ab107052, Abcam)
ウサギ抗 C6orf57 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab122196, Abcam)
ウサギ抗 SUCLA2 モノクローナル抗体 (1:1,000, ab202582, Abcam)
ウサギ抗 SUCLG1 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab204432, Abcam)
ウサギ抗 PLD6 ポリクローナル抗体 (1:1,000, ab170183, Abcam)
ウサギ抗 succinyllysine ポリクローナル抗体 (1:1,000, , PTM BIOLABS, Chicago, USA)
ウサギ抗 Total OXPHOS blue native 抗体カクテル (1:1000, ab110412, Abcam)
HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (1:20,000, ab97051, Abcam)
HRP 標識ロバ抗マウス IgG 二次抗体 (1:5,000, sc-2314, Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA)

<5> キット

Pierce BCA タンパク質アッセイキット (23225, Thermo Fisher Scientific)
 β -Hydroxybutyrate Assay Kit (Fluorometric) (ab180876, Abcam)
QuantiChrom™ Heme Assay Kit (DIHM-250, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)
Complex II immunocapture kit (ab109799, Abcam)

<6> 細胞培養関連

ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum) (171012; Gibco-Life Technologies, Carlsbad, California, USA)

ペニシリン-ストレプトマイシン (15070063; Gibco-Life Technologies)
高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (D5796; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

<7> ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE), ウェスタンブロット法関連
10x Cell Lysis Buffer (98035, Cell Signaling Technology [CST], Beverly, Massachusetts, USA)

cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (04693124001, Roche, Mannheim, Germany)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (P7626, Sigma-Aldrich)

PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (04906845001, Roche)

アルブミンスタンダード (23209, Thermo Fisher Scientific)

SDS-PAGE サンプル緩衝液: SDS-PAGE 用プレミックスタンパク質サンプルバッファ
ー (#161-0737, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA)

タンパク質分子量マーカー (#161-0377, Bio-Rad Laboratories)

Bio-Safe クマシー-G-250 ステイン (#161-0786, Bio-Rad Laboratories)

Ponceau-S staining solution (#BCL-PSS-01, Beacle Inc, Kyoto, Japan)

ECL Western Blotting Detection Reagent (RPN2109, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE Healthcare)

SuperSignal West Dura (34075, Thermo Fisher Scientific)

SuperSignal West Femto (34095, Thermo Fisher Scientific)

<8> PCR 関連試薬

QuickGene RNA cultured cell kit S (Wako Pure Chemical Industries)

QuickGene RNA tissue kit S (Wako Pure Chemical Industries)

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)

<9> Primers

crls1 (Mm01278100_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

sdhaf1 (Mm03015264_s1, Applied Biosystems)

il6 (Mm00446190_m1, Applied Biosystems)

il1b (Mm00434228_m1, Applied Biosystems)

tnfa (Mm00443258_m1, Applied Biosystems)

car9 (Mm00519870_m1, Rn01764733_m1, Applied Biosystems)

slc2a1 (glut1) (Mm00441480_m1, , Rn01417099_m1, Applied Biosystems)
gapdh (4352338E, 4352339E, Applied Biosystems)

<10> siRNA 関連

Opti-MEM (#31985062, Thermo Fisher Scientific)
DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent (T2001, Dharmacon, Chicago, USA)
Crls1 (Rat, #L-093152-02-0020, Dharmacon)
Sdha (Mouse, #L-046818-01-0005, Dharmacon)

<11> ミトコンドリア呼吸能関連試薬

CaCO₃ (C4830, Sigma-Aldrich)
KOH (P-1767, Sigma-Aldrich)
EGTA (E4378, Sigma-Aldrich)
Na₂ATP (A2383, Sigma-Aldrich)
MgCl₂ (19-0190-5, Sigma-Aldrich)
Taurine (T0625, Sigma-Aldrich)
Na₂Phosphocreatine (P7936, Sigma-Aldrich)
Imidazole (56750, Fluka)
Dithiothreitol (DTT) (D0632, Sigma-Aldrich)
MES hydrate (M8250, Sigma-Aldrich)
KH₂PO₄ (104873, Millipore)
HEPES (H7523, Sigma-Aldrich)
D (+) -Sucrose (4621, Carl-Roth, Karlsruhe, Germany)
Pottassium lactobionate (153516, Sigma-Aldrich)
BSA (A6003, Sigma-Aldrich)
Saponin (S7900, Sigma-Aldrich)
FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) (C2920, Sigma-Aldrich)
AmplexTM UltraRed (A36006, Thermo Fisher Scientific)
Horseradish Peroxidase (HRP) (P8415, Sigma-Aldrich)
Superoxide dismutase (SOD) (S9697, Sigma-Aldrich)
Proteinase (P8038, Sigma-Aldrich)

<12> BN-PAGE 関連試薬

4×NatvePAGETM Sample Buffer (BN2003, Thermo Fisher Scientific)

NatvePAGE™ 5% G-250 Sample Additive (BN2004, Thermo Fisher Scientific)
Digitonin (5%) (BN2006, Thermo Fisher Scientific)
NativeMark™ Unstained Protein Standard (LC0725, Thermo Fisher Scientific)
Imidazole (I-2399, Sigma-Aldrich)
Glycine (077-00735, Wako Pure Chemical Industries)
Tricine (T0377, Sigma-Aldrich)
SDS (191-07145, Sigma-Aldrich)

<13>サクシニル化, 脱サクシニル化関連試薬, 調製試薬

Glycine (077-00735, Wako Pure Chemical Industries)
Succinyl-CoA (S1129, sigma)
2-Deoxy-D-glucose (D8375, sigma)
Iodoacetic acid (I4386, sigma)
Tyrphostin A9 (T182, sigma)
Acetyl-CoA (A2056, sigma)
Phosphotransacetylase from Bacillus stearothermophilus (P2783, sigma)
Lithium potassium acetyl phosphate (01409, sigma)
Recombinant human SIRT5 (CY-E1155, MBL, Nagoya, Japan) 20180622

- Desuccinylation medium: 5 mM acetyl phosphate, 0.2 mM di-thiothreitol, 5 mM MgCl₂, 10 U phos-photransacetylase/ml, 0.4% (mass/vol.) Triton X-100, 15% (by vol.) glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4.
± 0.1 or 1 mM Acetyl-CoA, 10 or 100 U/ml Phosphotransacetylase.

<14> 免疫沈降関連試薬

Lauryl maltoside (ab109857, abcam)

<15> 調製試薬類

タンパク質電気泳動, ウェスタンブロット法

SDS-PAGE 泳動緩衝液: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

SDS-PAGE 転写緩衝液: 25mM Tris, 0.192mM Glycine, 10% Methanol

20×TBS: 0.4M Tris/HCl (pH 7.6), 3M NaCl,

1×TBST: 20×TBS を純水で 20 倍に希釈し, 0.05%となるように Tween20 を加えた.

10×PBS: 1.37M NaCl, 81mM Na₂HPO₄, 27mM KCl, 15mM KH₂PO₄

1×PBS : 10×PBS を純水で 10 倍に希釈した.

動物麻酔用試薬

- MI 手術用 3 種混合麻酔 :
ミダゾラム (ドルミカム®注射液) 0.3mg/kg (Astellas Pharma, Tokyo, Japan)
塩酸メデトメジン (ドルベネ®注) 0.4mg/kg (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)
酒石酸ブトルファノール (ベトルファノール®) 5mg/kg (Meiji Seika Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- 短時間用麻酔薬 :
2,2,2-Tribromoethanol (Avertin) 1g / 2-Methyl-2-butanol (240486, Sigma-Aldrich) 1ml
上記を 2 種を混合した stock solution を作製し, working solution は PBS で 40 倍希釈したものを使用した.

炎症反応モデルマウス用試薬

Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 (L8274, sigma)

低酸素モデル用試薬

Deferoxamine mesylate salt (DFO) (D9533, sigma)

ミトコンドリア呼吸能用調製試薬

- BIOPS (pH 7.1) : 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂/6H₂O, 20 mM Taurine, 15 mM Na₂Phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithiothreitol, 50 mM MES hydrate
- Isolation buffer for tissue (pH 7.4) : 100 mM Sucrose, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 1 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin
- Isolation buffer for cells : HEPES-KOH (pH 7.4) , 220 mM D-mannitol, 70 mM Sucrose
- Suspension buffer (pH 7.4) : 225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 0.1 mM EDTA
- MiR05 buffer : 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20mM Taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 60mM Pottasium lactobionate, 1 g/L BSA
- Saponin solution : BIOPS 溶液 1 ml に Saponin 5 mg を溶解して, ストック溶液 (5 µg/µl) を作成. Permeabilization 時は BIOPS 溶液 2 ml に上記ストック溶液を 20 µl 溶解し, 最終濃度 0.05 µg/µl とした. (用事調製)

BN-PAGE 用調製試薬

- Sucrose buffer : 250 mM Sucrose, 20 mM Imidazole/HCl, pH 7.0
- Anode buffer : 250 mM Imidazole (pH 7.0)
- Cathod buffer : 500 mM Tricine, 75 mM Imidazole, 0.2% Coomassie G-250
- Denature buffer : 20 mM Tris, 200 mM Glycine, 0.1% SDS

第2章 ミトコンドリア complex I, complex II 機能の比較に関する研究

2.1. 実験1: C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける complex I, complex II 機能の比較に関する研究

2.1.1. 緒言

ミトコンドリアはエネルギーを産生する上で中心的な役割を担っており、酸化リン酸化により ATP が産生される。これまでにミトコンドリアの機能不全が様々な疾患の発症、進展に関わることが報告されてきた(Fisar et al., 2016; Lerner et al., 2016; Madamanchi and Runge, 2007; Reimann et al., 2003; Rutter et al., 2010; Sharov et al., 2000).

心臓は絶え間なく全身に血液を送るポンプとして機能するために持続的なエネルギー供給を必要とする臓器である(Rosca and Hoppel, 2010)。心臓のような多くのエネルギーを必要とする臓器は特にミトコンドリア機能不全に影響されやすい(Renkema et al., 2015; Russell et al., 2014)。心臓の機能異常は心不全の原因となり、生活の質や生命予後を低下させるため、心筋のミトコンドリアが果たす役割は極めて重要であるといえる。

ミトコンドリアの酸化リン酸化は電子伝達系を構成する complex I, II, III, IV と ATP 合成酵素である complex V により担われている(図 2-1)。NADH や FADH₂ の電子が complex I または II から complex III, IV に伝達される間にミトコンドリア内膜の内外にプロトンの濃度勾配がつくられ、この濃度勾配を利用して complex V によって ATP が合成される(Dudkina et al., 2010; Ricci et al., 2004; Vartak et al., 2013)。

ミトコンドリアの酸化リン酸化を構成する複合体の中で、complex I, III, IV はさらなる複合体である supercomplexes (SCs, 超複合体) を構成する。この SCs は真菌、植物からマウス、ヒトまで多くの種に保存されており(Dudkina et al., 2005; Rosca et al., 2008; Takada et al., 2016)、効率的な電子伝達を可能にし、活性酸素種

(ROS) 産生を制御するなど、SCs を構成することは機能的に重要と言える(Davoudi et al., 2014)。一方で、complex II はこの SCs には含まれていないと考えられている(Bianchi et al., 2004; Gomez et al., 2009; Schafer et al., 2007; Schagger and Pfeiffer, 2000; Wittig and Schagger, 2005)。Complex II はコハク酸脱水素酵素 (SDH: succinate dehydrogenase) とも呼ばれるタンパク質で、4つのサブユニット

(SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) から構成される。Complex II は TCA サイクルと電子伝達系の両者に関わるタンパク質であり、電子伝達系を構成するタンパク質では唯一プロトンポンプとしての働きを持たない、ミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質を含まない等ユニークな特徴をもつタンパク質である(Van

Vranken et al., 2015). TCA サイクルにおいて complex II は succinate を fumarate へ酸化する酵素であり、このとき同時にユビキノン還元して得られた電子が電子伝達系の complex III, complex IV へと伝達される(Van Vranken et al., 2015). このように complex II は TCA サイクル, 電子伝達系の両者において重要な役割を果たすタンパク質である (図 2-1).

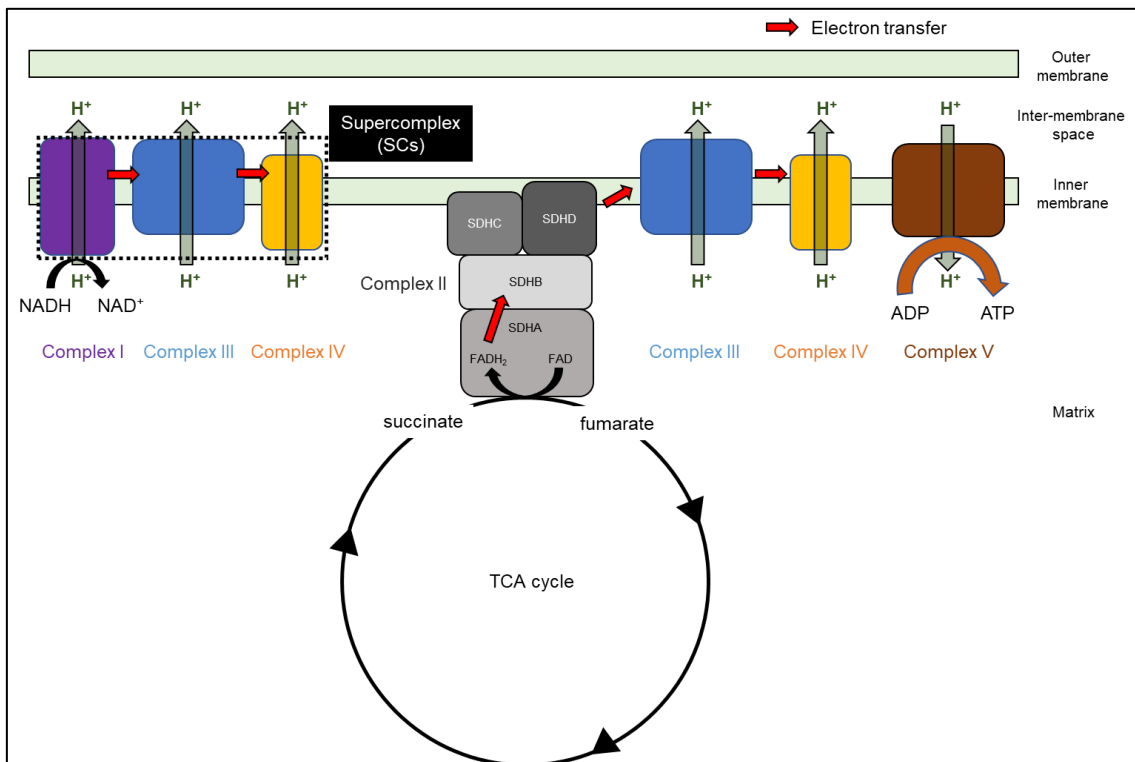


図 2-1. 酸化リン酸化および TCA 回路における ATP 産生の模式図

Complex II は SCs に含まれていないこともあり、ミトコンドリアの研究ではこれまで complex I に関する研究が主に行われてきた。近年、徐々に complex II に関する研究も行われるようになり、complex II の機能不全が様々な疾患を引き起こすことが報告されるようになった。例えば、Alston らは心筋症がミトコンドリア機能不全に関連することを報告した。彼らは男児の拡張型心筋症の症例を報告し、SDHA の変異による complex II 機能不全が心筋症の原因とした(Alston et al., 2012).

このように complex II に関する研究が徐々に増えてきているが、complex II がミトコンドリアの ATP 産生においてどの程度重要であるのか、すなわち、ミトコンドリア全体の ATP 産生能のうち complex II がどの程度寄与しているかは明らかではない。上述したように complex II は、効率的な電子伝達を行うために構成される SCs には含まれていないことから、我々は「complex II の機能は complex I の機能よ

り低い」という仮説を立てた。実験 1 では、complex II の機能が心筋ミトコンドリア全体のどの程度を占めているかを明らかにすることを目的とし、マウスの心筋のミトコンドリアにおいて complex I, complex II の呼吸能を比較した。

また、あるタンパク質複合体の機能を制御する要因として、機能する形態である複合体としてのタンパク質の発現量が挙げられる。例えば、SCs の複合体としての発現量が低下すると complex I 呼吸能が低下することが報告されている(Rosca et al., 2008)。このことから、complex II の機能は complex II (SDH 複合体) の発現量と相関すると推測し、これを検証するために、complex II の発現量と機能を測定し、両者の関係性を評価した。

2.1.2. 方法

2.1.2.1. ミトコンドリア単離

麻酔下に、心筋を迅速に摘出し、ミトコンドリアを以下の手順で単離した。

- 1) マウスを屠殺して心臓を摘出し、各々40 mg 程度を切り取って BIOPS に漬けた。
- 2) 1 ml isolation buffer の入った 2 ml マイクロチューブへ検体を入れた (図 2-2A)。
- 3) はさみをエッペンチューブ内に挿入し、4 分間 mince をした (図 2-2B)。
- 4) ピペットを用いて isolation buffer 1 ml を勢いよく入れ、2 分静置した。
- 5) 上清を 1 ml 捨て、あらたに isolation buffer 1 ml を加え、また 2 分静置した (3 回繰り返した)。
- 6) 0.2mg の Protease を 1ml の isolation buffer で溶解した。
- 7) Protease 溶液 1 ml を加え、30 秒ごとに転倒混和しながら、2 分間反応させた。
- 8) Douncer (図 2-2C) に mince, protease 処理後の組織を移した。
- 9) 電動ドリル付きテフロン棒を用いて、1 回 20 秒かけて計 6 回ホモジナイズした。
- 10) Isolation buffer を、Douncer に 1.5 ml, 15 ml コニカルチューブに 1.5 ml, 計 3 ml 入れた。
- 11) ホモジナイズ溶液を 15 ml コニカルチューブへ移した。
- 12) 遠心 (4°C, 750 g, 10 分) した (図 2-2D)。
- 13) 上清を、2 本の 2 ml マイクロチューブへ移した。
- 14) 遠心 (4°C, 10,000 g, 10 分) し、上清を破棄した。
- 15) 650 μ l の isolation buffer を加え、ペレット周囲の結合織を分離し、上清を破棄した。
- 16) 300 μ l の isolation buffer を加え、溶液化したペレットを一つにまとめた (図 2-2E)。
- 17) 遠心 (4°C, 7,000 g, 3 分) し、上清を破棄した。
- 18) Suspension buffer 80 μ l を加え、十分に溶解した。

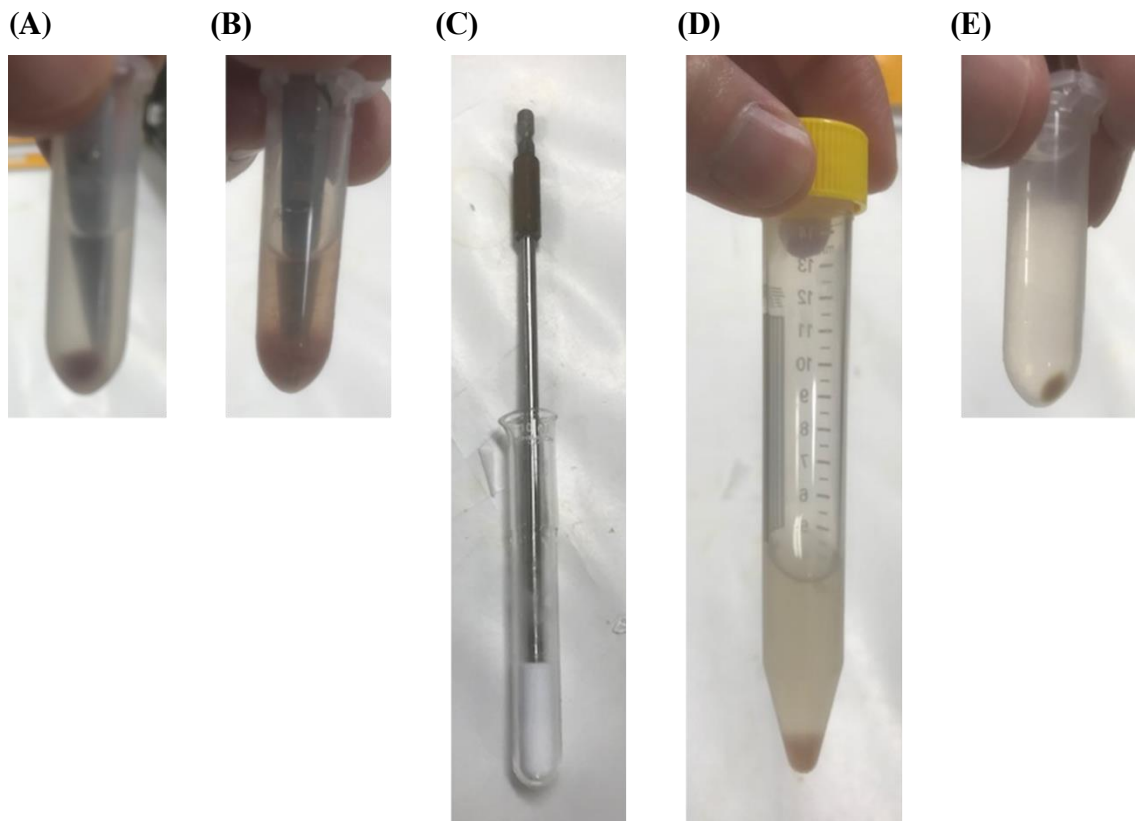


図 2-2. ミトコンドリア単離の写真

2.1.2.2. ミトコンドリアタンパク質濃度測定

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレートに Pierce BCA タンパク質アッセイキットの Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混合した working reagent を作成し，各ウェルに 200 μ l ずつ分注した.
- 2) ブランクとして 1 穴空白を置き，2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1, 2, 4, 8, 16 μ l ずつウェルに混合した.
- 3) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した.
- 4) 37°C で 30 分間インキュベートした.
- 5) マイクロプレートリーダーで 590 nm 波長の吸光度を計測した.
- 6) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルのタンパク質濃度を算出した.

上記のタンパク質濃度測定は，スタンダード，サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き，2 つの平均値を採用した.

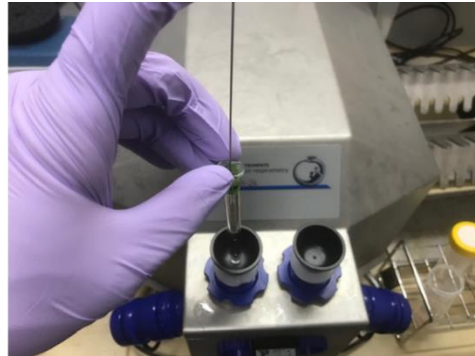
2.1.2.3. 心筋線維組織の細胞膜透過処理

- 1) マウスの安楽死後に心筋を取り出して、直ちに氷冷した組織保存溶液である BIOPS に漬けた.
 - 2) BIOPS 内で周辺組織を可及的に除去した.
 - 3) BIOPS 内で 18 ゲージの注射針 2 本を用いて心筋線維をほぐした.
 - 4) Saponin (界面活性剤) を含む BIOPS 溶液内で 30 分振蕩し, 細胞膜透過処理を行った.
 - 5) MiR05 溶液で 10 分 2 回洗浄した.
- 心筋 1.5~3 mg を MiR05 溶液で満たされたチャンバー内に投入し, ミトコンドリア呼吸能を測定した.

2.1.2.4. ミトコンドリア呼吸能 (酸化的リン酸化能 : OXPHOS)

ミトコンドリア呼吸能は, 上述の単離ミトコンドリア (50~100 μg), もしくは細胞膜透過処理後の心筋線維組織 (1.5~3 mg) を用いて, Innsbruck 社製オロボロス装置, Oxygraph-2k (以下, O2k) を使用し, 37°C の環境下で測定した (図 2-3). 2 ml のチャンバー内を, 2 ml の Mir05 溶液で満たし, 蓋をして空気を追い出した. 以下のプロトコルに従って基質を順番に加え, その時の酸素消費量を測定した. Datlab software を用いて, 酸素消費量を計算した. その際に, 組織重量当たりもしくはミトコンドリア当たりの補正を行った.

(A)



(B)

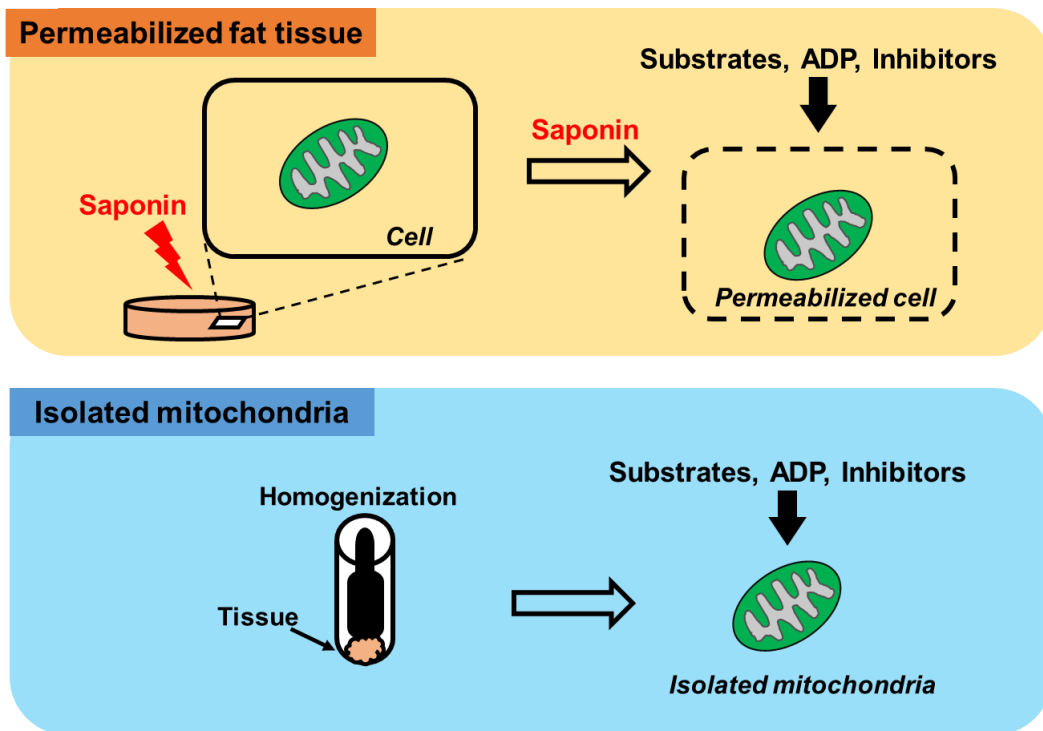


図 2-3. Oxygraph-2k および O2k へのサンプル添加の写真 (A), 心筋線維の膜透過処理とミトコンドリア単離の模式図 (B)

プロトコル

- 1) 0.3 M の塩化マグネシウム MgCl_2 20 μl と 1 M の ADP 20 μl を加えた。
- 2) Complex I に関連する基質である, 2 M のグルタミン酸 glutamate 10 μl と 0.4 M のリンゴ酸 malate 10 μl と 2 M のピルビン酸 pyruvate 5 μl を加えた (CI_OXPPOS).
- 3) Complex II に関連する基質である, 1 M のコハク酸 succinate 20 μl を加えた (CI+II_OXPPOS).
- 4) Complex II 単独の OXPPOS の呼吸を観察するため, complex I の阻害剤である 1 mM のロテノン rotenone 1 μl を加えた (CII_OXPPOS).
- 5) ADP 非依存的な leak state の呼吸を観察するため, ATPase の阻害薬である 5 mM のオリゴマイシン oligomycin 1 μl を加えた (CII_LEAK).
- 6) 最大の呼吸機能を見るため, 脱共役剤である 0.4 mM の carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 5 μl を加えた (CII_ETS).
- 7) Complex III の阻害薬である, 5 mM のアンチマイシン antimycin a 1 μl を加え, ミトコンドリアに関係する呼吸を停止させた (ROX).

- 8) Complex IV の基質である 0.8 M のアスコルビン酸 ascorbate 5 μ l と 0.1 M の N,N,N',N'-tetramethyl-p- phenyldiamine (TMPD) 10 μ l を加えた時の呼吸能を測定した。次に、阻害剤である 4 M のアジ化ナトリウム sodium azide 50 μ l を加えた時の呼吸能を測定し、その差分を計算した (CIV_OXPHOS)。

2.1.2.5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

サンプルの調製

- 1) 上記サンプルを 1×Cell Lysis Buffer を用いて 8 μ g/ μ l となるように調製した。2-メルカプトノールを添加した SDS-PAGE 用サンプル緩衝液をサンプル溶液と等量加え、4 μ g/ μ l のサンプル溶液を作成した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。
- 2) ヒートブロックを用いて、100°Cで3分間加熱した。
- 3) 短時間遠心してマイクロチューブの蓋に付着した水滴を落とし、ボルテックスミキサーでサンプル溶液を攪拌した。

電気泳動

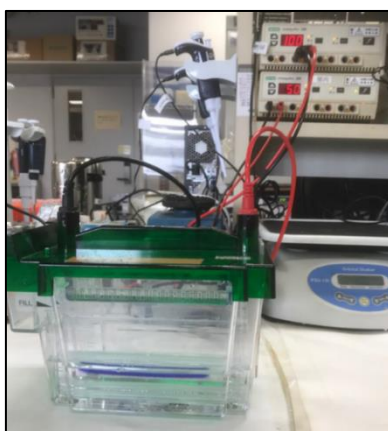


図 2-4. 電気泳動の写真

- 1) 電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲルを使用した。使用するゲルの種類は泳動するサンプル数や標的タンパク質によって適宜選択し、25~75 kDa のタンパク質を標的とする際は主に AnyKD の濃度ゲルを、75 kDa 以上の高分子量タンパク質を標的とする際は主に 7.5%の濃度ゲルを、25 kDa 以下の低分子量タンパク質を標的とする際は主に 18%の濃度ゲルを使用した。
- 2) 電気泳動槽に SDS-PAGE 泳動緩衝液を注入し、タンパク質ゲルをセットした。サンプルを標的タンパク質に応じて各ウェルに 20~40 μ g を注入し、サンプルレ

ーンの端に分子量マーカーを注入した。

- 3) パワーサプライに接続し、60 V の定電圧で30 分間、引き続いて100 V の定電圧でおよそ1 時間30 分程度泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した (図 2-4)。

Comassie brilliant blue (CBB) 染色

泳動後、ゲルを蒸留水で3 回、各5 分間洗浄した後に CBB 溶液に浸し、室温で1 時間振とうした (図 2-5A)。その後、蒸留水で3 回洗浄し、背景と比べてタンパク質のバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた (図 2-5B)。

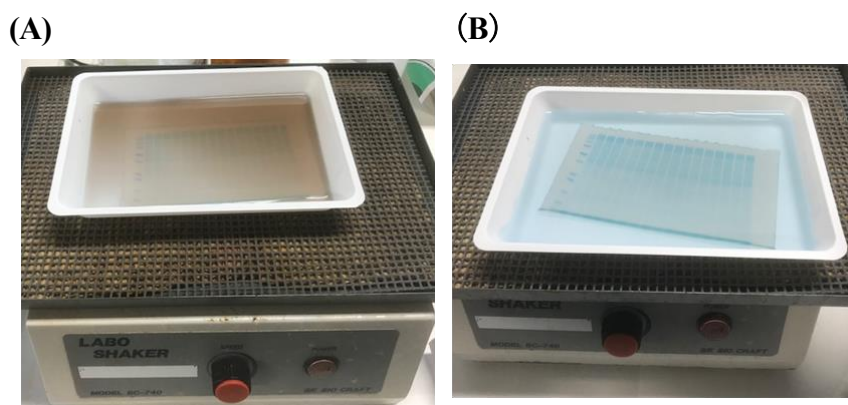


図 2-5. CBB 染色の写真

ブロッキング

1 セミドライ式ブロッキング

- 1) タンパク質ゲルを PVDF 転写パックに気泡が入らないようにセットした (図 2-6A)。
- 2) 2.5 A, 25 V で7 分間転写した (図 2-6B)。

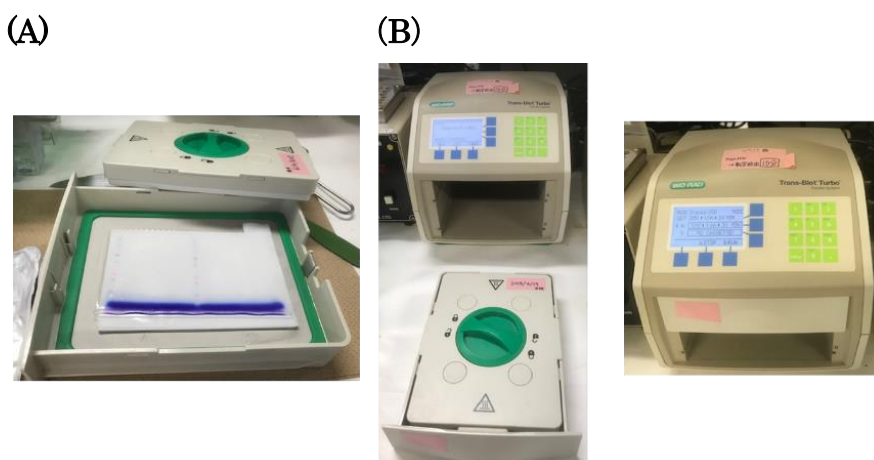


図 2-6. セミドライ式ブロッキングの写真

2 ウェット式ブロッティング

- 1) PVDF 膜をあらかじめメタノールで 1~2 分間浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。
- 2) タンパク質ゲルをタンク式ブロッティング装置の陽極から順に、スポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、50V の定電圧で 3 時間転写した (図 2-7)。



図 2-7. ウェット式ブロッティングの写真

ブロッキング～1 次抗体反応～二次抗体反応

- 1) ブロッティング後の PVDF 膜をブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振とうした。ブロッキング溶液には 3% スキムミルクを用いた。
- 2) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間, 3 回) した。
- 3) 1 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、4°C で 1 晩抗体反応を行った。
- 4) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間, 3 回) した。
- 5) 2 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、室温で 1 時間抗体反応を行った。
- 6) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間, 3 回) した。

検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL, ECL Prime, SuperSignal West Dura もしくは SuperSignal West Femto を使用した。

- 2) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで可視化されたバンドを検出した (図 2-8)。
- 3) 画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health) を用いて集積光濃度を定量して解析した。なお, CBB 染色または Ponceau 染色で定量した値を総タンパク質として補正した。



図 2-8. ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムの写真

2.1.2.6. ブルーネイティブ電気泳動法

既報のプロトコールを参考に(Wittig et al., 2006), NativePAGE™ Bis-Tris Gel system を用いて実験を行った。

- 1) 2.1.2.1.の方法で心筋ミトコンドリアを単離した。
- 2) 2.1.2.2.に記載した方法に準じて BCA 法で単離したミトコンドリアのタンパク質濃度測定を行った。
- 3) サンプルを 4×NativePAGE™ sample buffer と蒸留水で溶解し, 最終濃度 1%となるようにジギトニンを加えた。
- 4) 電気泳動を行う直前に, 最終濃度 0.25%となるように NativePAGE™ 5% G-250 Sample Additive を加えた。
- 5) 泳動槽に NativePAGE™ 4-16% Bis-Tris Protein Gels をセットし, サンプルおよび分子量マーカーをレーンに注入した。
- 6) 泳動槽外側の陰極に anode buffer を, 泳動槽内側の陽極に cathod buffer を入れ, 複合体維持のために氷上で泳動を行った。10 mA で 1 時間泳動し, 続けて 150 V で 2 時間泳動した。泳動の後半 2 時間は, CBB G-250 が PVDF に吸着して抗体の反応性を弱める原因となるので, 陰極の anode buffer を CBB を含まない cathod buffer に交換した (図 2-9)。
- 7) 泳動後のゲルを denature buffer に 30 分浸した。これはブルーネイティブ電気泳動法では複合体形成が維持されているために抗体認識部位等が内側に入り込ん

で認識が悪い場合が多いので、denature の過程でゲル内で複合体を壊しておくことが抗体の反応性向上に繋がるためである。

- 8) 2.1.2.5.のポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ブロットニングの項で述べた方法に準じてウェット式ブロットニングを行った。25V で2時間転写した。
- 9) メタノールで膜表面のCBB を除去した。
- 10) 3%スキムミルクを含むTBST 溶液で1時間振とうし、PVDF 膜をブロッキング処理した。
- 11) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10分間、3回）した。
- 12) 1次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、4°Cで1晩抗原抗体反応を行った。
- 13) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10分間、3回）した。
- 14) 2次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、室温で1時間抗体反応を行った。
- 15) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10分間、3回）した。
- 16) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の検出の項と同様の方法で検出した。



図 2-9. ブルーネイティブ電気泳動法の写真

2.1.2.7. 統計学的解析

統計処理は、GraphPad Prism 7 software（Graphpad Software, San Diego, California, USA）を用いて行った。データは、平均値±標準誤差で示した。2群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った。2群間の相関を評価するために単回帰分析を行った。 P -values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

2.1.3. 結果

2.1.3.1. 心筋から単離したミトコンドリア分画の確認

心筋から単離したミトコンドリアと細胞質，細胞全体の lysate (whole cell lysate) に含まれる GAPDH, COXIV をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で確認した．細胞質のマーカである GAPDH はミトコンドリア分画には含まれず，ミトコンドリアマーカである COXIV は細胞質にほとんど含まれていなかった (図 2-10)．このことから，純度の高いミトコンドリア分画が単離できていることを確認した．

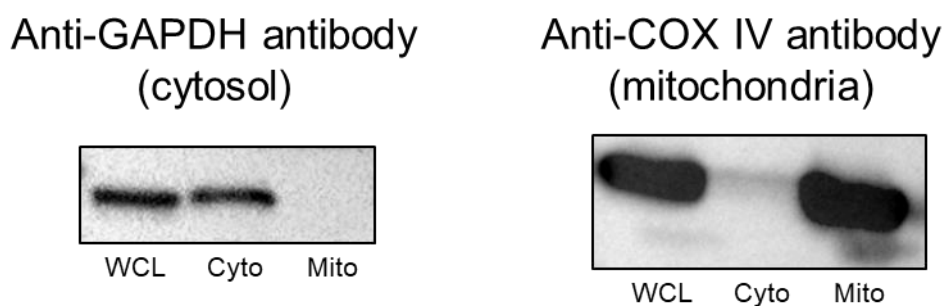
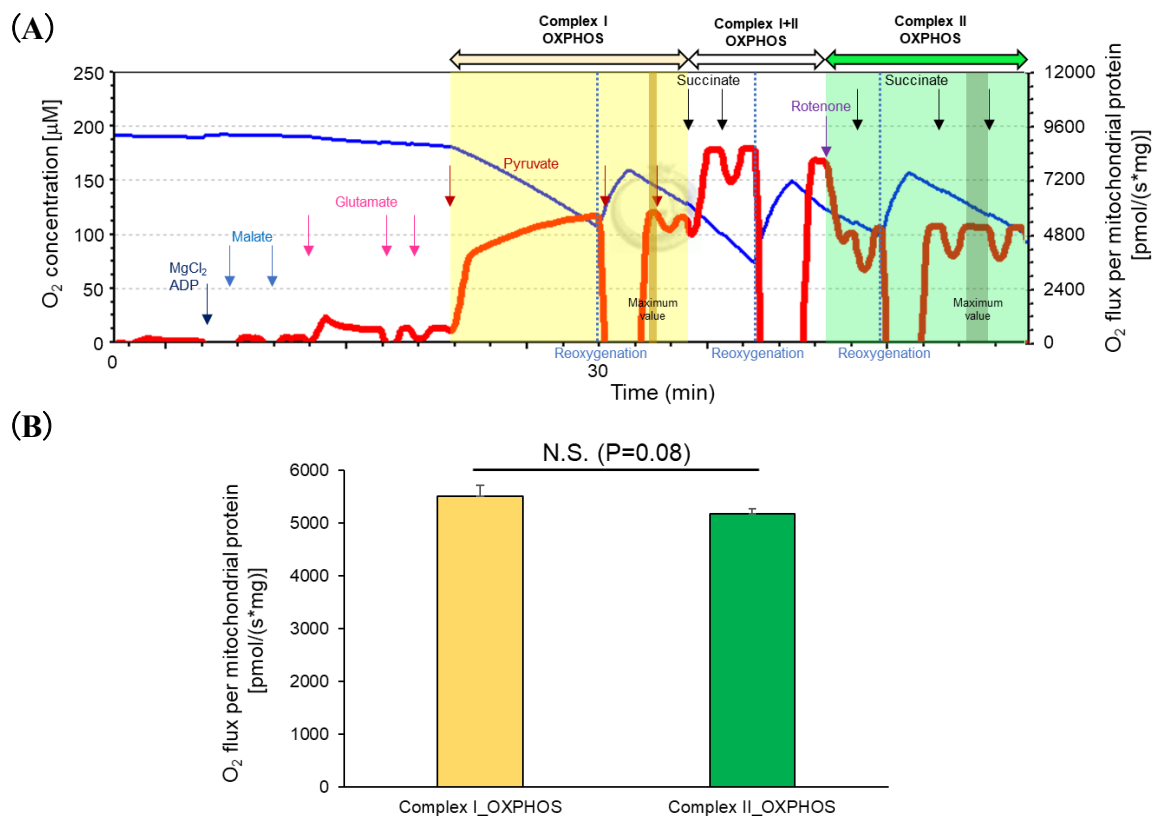


図 2-10. C57BL/6J マウス心筋の whole cell lysate (WCL)，細胞質 (Cyto)，ミトコンドリア (Mito) 各分画のポリアクリルアミドゲル電気泳動法による評価．

2.1.3.2. 心筋ミトコンドリアにおける complex I, complex II 呼吸能の比較

C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアで呼吸能を測定した。その一例を図 2-11A に示す。それぞれの最大呼吸能を測定するため、酸素消費量がそれ以上上がらなくなるまで同じ基質を繰り返し加えた。黄色の部分 complex I の呼吸能、緑色の部分が complex II の呼吸能を示している。Complex I の呼吸能と complex II の呼吸能を比較したところ、complex II の呼吸能は complex I の呼吸能と同等であり、有意差はなかった (図 2-11B)。



サンプル処理：ミトコンドリア単離

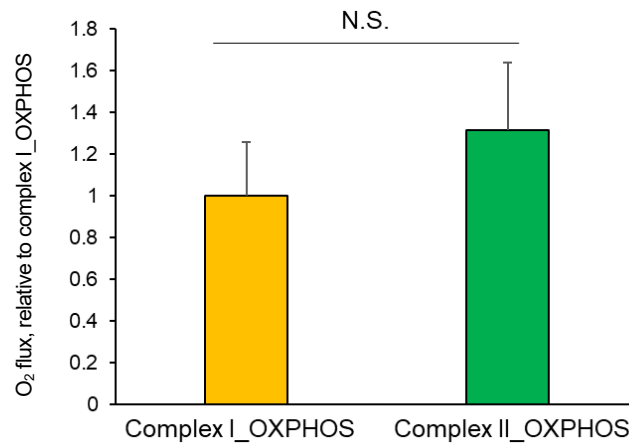
プロトコル

1. Glutamate + Malate + Pyruvate
2. MgCl₂ + ADP (CI_OXPHOS)
3. Succinate (CI + II_OXPHOS)
4. Rotenone (CII_OXPHOS)

図 2-11. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリア呼吸能測定の一例 (A). C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける complex I, complex II 呼吸能の比較 (B). データは平均値±標準誤差 (n=8). N.S. 有意差なし.

2.1.3.3. 心筋組織における complex I, complex II 呼吸能の比較

C57BL/6J マウスの心筋組織における呼吸能を測定した。ミトコンドリア当たりの比較と同様に、complex II の呼吸能は complex I の呼吸能と同等であり、有意差はなかった (図 2-12)。



サンプル処理：サポニンによる筋組織の細胞膜透過処理

プロトコル

1. MgCl₂ + ADP
2. Malate + Glutamate + Pyruvate (CI_OXPPOS)
3. Succinate
4. Rotenone (CII_OXPPOS)

図 2-12. C57BL/6J マウス心筋組織当たりの complex I, complex II 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3). N.S. 有意差なし.

2.1.3.4. 心筋ミトコンドリアにおける complex II 発現量と呼吸能の相関

複合体としての complex II の発現量を評価するため、タンパク質を変性させずに複合体タンパク質の発現量を評価するブルーネイティブ電気泳動法で complex II の発現量を評価した。予備実験として、C57BL/6J マウスの心筋ミトコンドリアを使用して SDHA, SDHB, SDHC, SDHD に対する抗体でブロッキングした (図 2-13)。4 つの抗体によるブロッキングで同じ高さにバンドを検出したことから、このバンドが complex II であると考えた。SDHC や SDHD に対する抗体でのブロッキングでは SDHA や SDHB の抗体での評価よりもバンドが不明瞭であり、発現量の評価は困難と考えられたため、発現量の評価は SDHA, SDHB に対する抗体を使用し行うこととした。

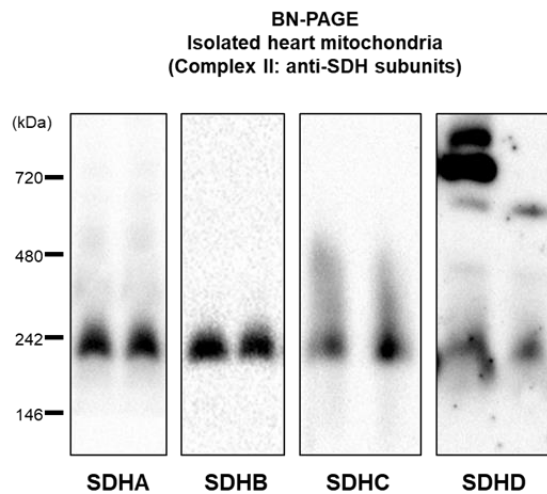


図 2-13. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおけるブルーネイティブ電気泳動法による complex II の評価. n=2.

SDHA, SDHB に対する抗体を使用してミトコンドリア当たりの complex II の発現量を定量し, complex II の呼吸能との相関関係を評価したところ, SDHA もしくは SDHB 抗体による complex II 発現量と呼吸能は有意に相関した (図 2-14).

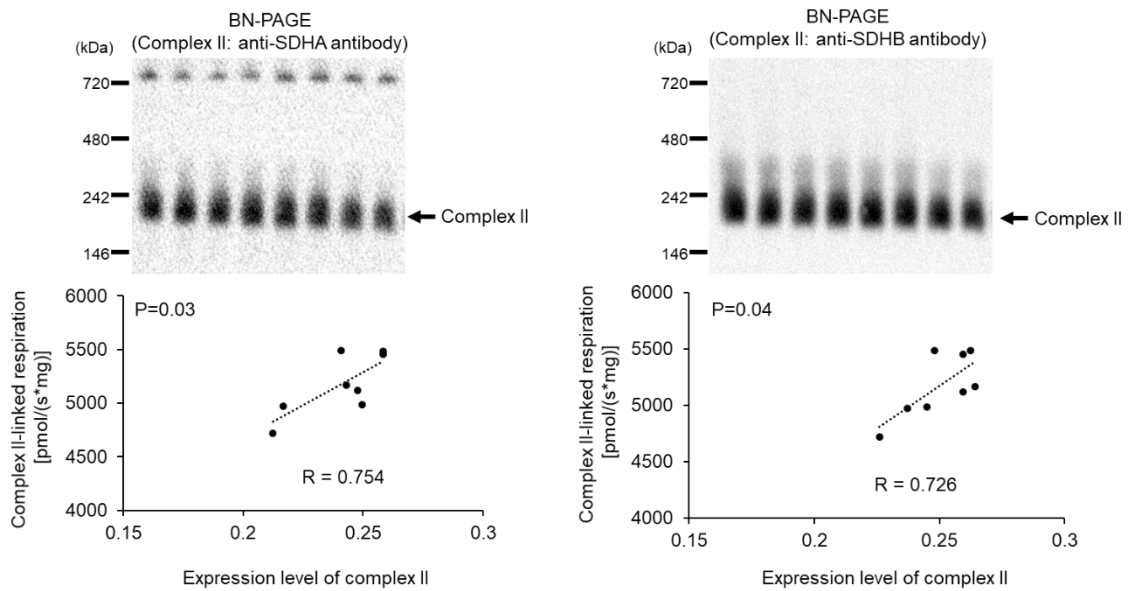


図 2-14. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける complex II 発現量と complex II 呼吸能との相関. R は相関係数 (n=8).

2.1.3.5. 心筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量と complex II 呼吸能の相関

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により定量した SDHA, SDHB サブユニットの発現量と complex II の呼吸能との間に有意な相関はなかった (図 2-15).

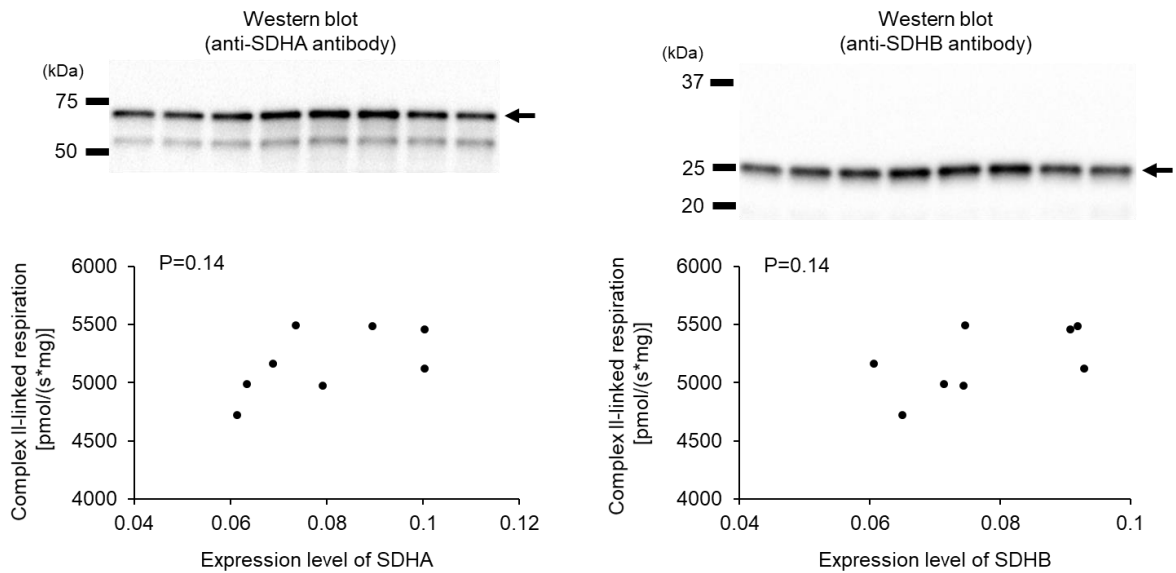


図 2-15. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量 (SDHA, SDHB) と complex II 呼吸能との相関. n=8.

2.1.3.6. 心筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量と complex II の発現量の相関

心筋ミトコンドリアにおいて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により定量した SDHA, SDHB サブユニットの発現量とブルーネイティブ電気泳動法 (SDHA, SDHB に対する抗体を使用して発現量を評価) により定量した complex II の発現量との間に有意な相関はなかった (図 2-16)。

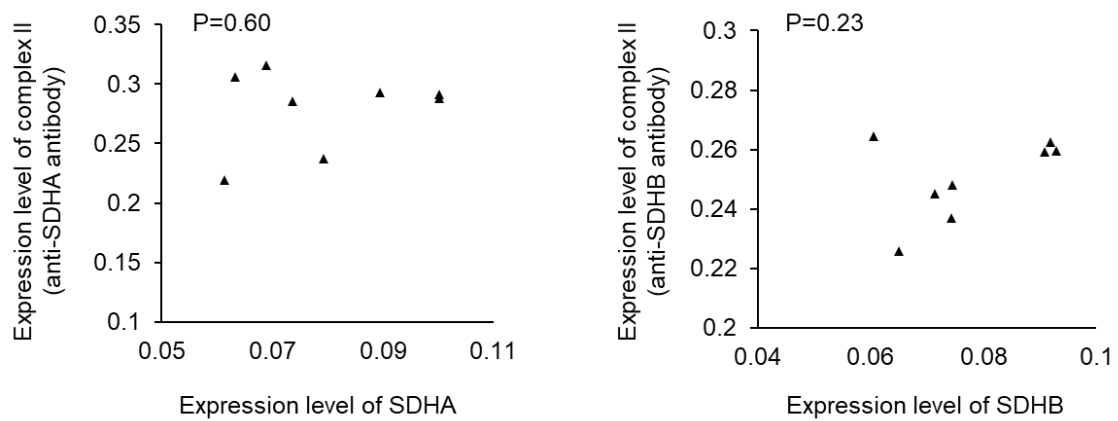


図 2-16. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量 (SDHA, SDHB) と complex II の発現量との相関. n=8.

2.1.4. 考察

心筋組織当たり、心筋から単離したミトコンドリア当たりで complex I, II それぞれの呼吸能を評価したところ、いずれの評価においても、我々の仮説に反して complex II の呼吸能は complex I の呼吸能と同等であった (図 2-11, 2-12). 各 complex の発現量は本研究では比較しなかったが、これまでの研究でミトコンドリア当たりの complex I と II のタンパク質量の比率は 1 : 1.5~3 と報告されている (Capaldi et al., 1988; Hatefi, 1985; Schagger and Pfeiffer, 2001; Smith et al., 1980). これらのことから、complex II は SCs に含まれていないため complex I に比較して complex I 1 つ当たりの ATP 産生効率はやや低いが、ミトコンドリア当たりのタンパク質量で代償され、その結果ミトコンドリア当たりの呼吸能でみると complex II は complex I と同等であったと考えられた. ミトコンドリアの呼吸能は ATP 産生能と比例することが報告されており (Julienne et al., 2012; Lark et al., 2016), 呼吸能が同等であるという結果は、complex II の ATP 産生能は complex I のそれと同等であることを意味する. つまり、ATP 産生において complex II の果たす役割は大きく、心筋ミトコンドリアの機能を評価する際には complex I だけでなく complex II の機能も評価しなければならない.

Complex II の呼吸能は complex II の発現量と相関した (図 2-14) が、complex II のサブユニットの発現量とは相関しなかった (図 2-15). Complex II のサブユニットの発現量が complex II の呼吸能と相関しなかったことから、complex II のサブユニットの一部は complex II の機能とは関与しないと考えられる. すなわち、complex II に含まれずにフリーの状態で存在するか、他の複合体を形成していると推測された. 実際、complex II の発現量は complex II のサブユニットの発現量とは相関しなかった (図 2-16). Complex II の発現量と呼吸能が相関したことから、complex II が正常に機能するためにはサブユニットが会合して complex II が複合体として形成されることが重要であることが示唆された. Complex II の機能が低下している疾患では complex II の会合不全が関与しているかどうかを評価すべきであると考えられた.

2.2. 実験2：C57BL/6J マウス骨格筋ミトコンドリアにおける complex I, complex II 機能の比較に関する研究

2.2.1. 緒言

骨格筋は人体で最大の組織であり様々な機能をもつ。運動や姿勢の維持の他に、収縮により熱を発生させ体温を維持する。また、マイオカインと呼ばれるタンパク質を分泌する内分泌器官としての働きも持つ(Covington et al., 2016)。これらの骨格筋機能は運動能力に影響し、複数の疾患で生命予後とも密接に関連することが報告されている(Kinugawa et al., 2015; Massie et al., 1996)。また、心筋と同様に骨格筋も多くのエネルギーを必要とする臓器であり、ミトコンドリア機能不全に影響されやすいと考えられる(Renkema et al., 2015; Russell et al., 2014)。これまでに、骨格筋ミトコンドリア機能低下が、骨格筋の疾患のみならず (Gehrig et al., 2016; Lemieux et al., 2016)、糖尿病、心不全、慢性閉塞性肺疾患、腎不全など他の臓器の疾患でも報告されてきた (Rabinovich et al., 2007; Yokota et al., 2009; Takada et al., 2013; Takada et al., 2014; Kinugawa et al., 2015)。さらに、骨格筋ミトコンドリア機能低下が高齢化に伴う骨格筋機能不全とも関連することが報告された(Short et al., 2005)。これらのことから、骨格筋のミトコンドリア機能を評価することは重要と言える。

2.1.1.でも述べたが、ミトコンドリア機能に関する研究は SCs に含まれる complex I に関する研究が主体であり、complex II に関する研究は complex I に比較して少なかった。しかし近年、complex II の機能不全が様々な神経筋疾患に関与することが報告されるようになってきた。例えば、Brich-Machin らは、complex II の欠損は進行性の視神経萎縮、運動失調、ミオパチーなどがみられる遅発性の神経変性疾患を引き起こすことを報告した(Birch-Machin et al., 2000)。この疾患患者は骨格筋ミトコンドリアにおいて complex I, III, IV は正常である一方で、complex II 機能が 50%低下していた。また、Jackson らは進行性の脳筋症の患者で SDHD の遺伝子異常により complex II が欠損した症例を報告した(Jackson et al., 2014)。

このように complex II の障害が疾患を引き起こすことを観察した研究が広く行われるようになってきたものの、骨格筋ミトコンドリアの ATP 産生において、そもそも complex II がどの程度の役割を担っているかを明らかにした研究はない。

第2章で述べたように心筋では complex I と complex II の呼吸能は同等であり、complex II の機能が重要であることが示唆された。骨格筋においても心筋と同様に、「複合体単体の機能は complex I が complex II より高いが、ミトコンドリア当りに含まれる複合体の量は complex II が多く、ミトコンドリア当たりもしくは骨格筋当たりで評価すると complex II の機能は complex I と同等である」という仮説を

立てた. この仮説を検証するために実験 2 では, C57BL/6J マウスの骨格筋ミトコンドリアで complex II の機能と complex I の機能を測定して比較した.

2.2.2. 方法

2.2.2.1. ミトコンドリア単離

2.1.2.1.の方法に準じて骨格筋からミトコンドリアを単離した。

2.2.2.2. ミトコンドリア濃度測定

2.1.2.2.の方法に準じて骨格筋から単離したミトコンドリアの濃度を測定した。

2.2.2.3. 骨格筋線維の細胞膜透過性処理

2.1.2.3.の方法に準じて骨格筋線維を細胞膜透過性処理した。

2.2.2.4. ミトコンドリア呼吸能

2.1.2.4.の方法に準じてミトコンドリア呼吸能を測定した。プロトコルは①②の2種類で測定した。

プロトコル①：最も基本的なプロトコル。Complex I, II の呼吸能を順に測定。

- 1) Complex Iに関連する基質である、グルタミン酸 glutamate 10 mmol/l とリンゴ酸 malate 2 mmol/l とピルビン酸 pyruvate 5 mmol/l を加え、leak state を観察した (CI_LEAK)。
- 2) ADP 依存的な OXPHOS の呼吸を観察するため、塩化マグネシウム MgCl₂ 3 mmol/l と ADP 10 mmol/l を加えた (CI_OXPHOS)。
- 3) Complex IIに関連する基質である、コハク酸 succinate 10 mmol/l を加えた (CI+II_OXPHOS)。
- 4) Complex II 単独の OXPHOS の呼吸を観察するため、complex I の阻害剤であるロテノン rotenone 0.5 μmol/l を加えた (CII_OXPHOS)。
- 5) ADP 非依存的な leak state の呼吸を観察するため、ATPase の阻害薬であるオリゴマイシン oligomycin 2.5 μmol/l を加えた (CII_LEAK)。
- 6) 最大の呼吸機能を見るため、脱共役剤である carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 1 μmol/l を加えた (CII_ETS)。
- 7) Complex III の阻害薬である、アンチマイシン antimycin a 2.5 μmol/l を加え、ミトコンドリアに関係する呼吸を停止させた (ROX)。
- 8) Complex IV の基質であるアスコルビン酸 ascorbate 2 mmol/l と N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine (TMPD) 0.5 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定した。次に、阻害剤であるアジ化ナトリウム sodium azide 100 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定し、その差分を計算した (CIV_OXPHOS)。

プロトコル② : Complex I, Complex II の阻害剤を加えてそれぞれ別々に測定.

Complex I 測定用のプロトコル

- 1) 塩化マグネシウム MgCl_2 3 mmol/l と ADP 10 mmol/l を加えた.
- 2) Complex II の阻害剤であるマロニル酸 malonate 5 mmol/l を加えた.
- 3) Complex I に関する基質である, グルタミン酸 glutamate 10 mmol/l とリンゴ酸 malate 2 mmol/l とピルビン酸 pyruvate 5 mmol/l を加え, complex I 単独の OXPHOS の呼吸を観察した (CI_OXPHOS).
- 4) ADP 非依存的な leak state の呼吸を観察するため, ATPase の阻害薬であるオリゴマイシン oligomycin 2.5 $\mu\text{mol/l}$ を加えた (CI_LEAK).

Complex II 測定用のプロトコル

- 1) 塩化マグネシウム MgCl_2 3 mmol/l と ADP 10 mmol/l を加えた.
- 2) Complex I の阻害剤であるロテノン rotenone 0.5 $\mu\text{mol/l}$ を加えた.
- 3) Complex II に関する基質である, コハク酸 succinate 10 mmol/l を加えた (CII_OXPHOS).
- 4) ADP 非依存的な leak state の呼吸を観察するため, ATPase の阻害薬であるオリゴマイシン oligomycin 2.5 $\mu\text{mol/l}$ を加えた (CII_LEAK).

2.2.2.5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.1.2.5.の方法と同様に行った.

2.2.2.6. ブルーネイティブ電気泳動法

2.1.2.6.の方法と同様に行った.

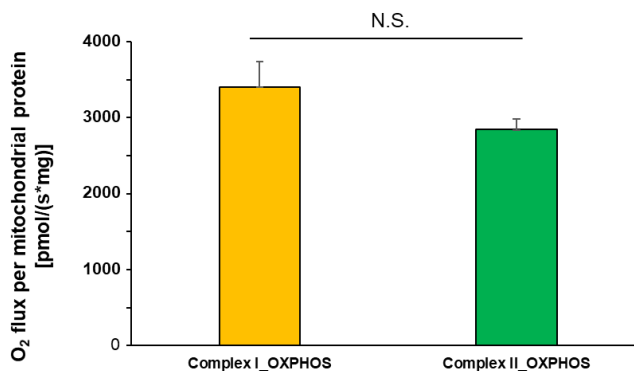
2.2.2.7. 統計学的解析

統計処理は, GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った. データは, 平均値 \pm 標準誤差で示した. 2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った. 2 群間の相関を評価するために単回帰分析を行った. P -values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した.

2.2.3. 結果

2.2.3.1. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能の比較

C57BL/6J マウスの腓腹筋から単離したミトコンドリアで呼吸能を測定した。心筋ミトコンドリアと同様， complex II の呼吸能は complex I の呼吸能に匹敵し，有意差はなかった（図 2-17）。



サンプル処理：ミトコンドリア単離

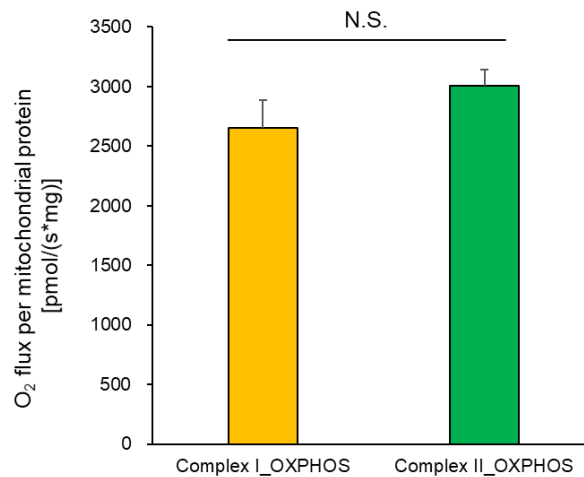
プロトコル

1. Glutamate + Malate + Pyruvate
2. MgCl₂ + ADP (CI_OXPPOS)
3. Succinate
4. Rotenone (CII_OXPPOS)

図 2-17. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=8). N.S. 有意差なし.

Complex I と II の呼吸能をより正確に評価するため、complex I の阻害剤を加えた状態で complex II の呼吸能を、complex II の阻害剤を加えた状態で complex I の呼吸能をそれぞれ測定したが、やはり complex II の呼吸能は complex I の呼吸能と同等であった (図 2-18)。



サンプル処理：ミトコンドリア単離

プロトコル (complex I)

1. MgCl₂ + ADP
2. Malonate
3. Glutamate + Malate + Pyruvate (CI_OXPPOS)
4. Olygomycin (CI_LEAK)

プロトコル (complex II)

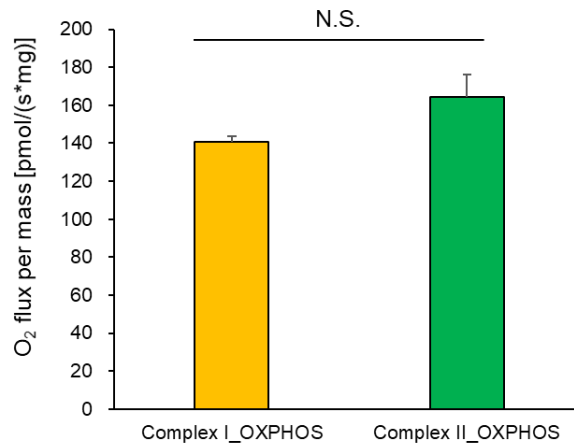
1. MgCl₂ + ADP
2. Rotenone
3. Succinate (CII_OXPPOS)
4. Olygomycin (CII_LEAK)

図 2-18. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能の比較 (complex I もしくは complex II の阻害剤を加えた評価)。

データは平均値±標準誤差 (n=3). N.S. 有意差なし.

2.2.3.2. 腓腹筋組織における complex I と complex II 呼吸能の比較

腓腹筋の筋組織当たりの呼吸能を測定して比較したところ、単離ミトコンドリアの結果と同様に、complex II の呼吸能は complex I の呼吸能と同等であった (図 2-19)。



サンプル処理：サポニンによる筋組織の細胞膜透過処理

プロトコル

1. Glutamate + Malate + Pyruvate
2. MgCl₂ + ADP (CI_OXPHOS)
3. Succinate
4. Rotenone (CII_OXPHOS)

図 2-19. C57BL/6J マウス腓腹筋組織における complex I と complex II 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3). N.S. 有意差なし.

2.2.3.3. 腓腹筋, ヒラメ筋, 長趾伸筋におけるミトコンドリア当たりの complex I と complex II の呼吸能, 呼吸調節率 (Respiratory control ratio; RCR) の比較.

RCR は ADP を加えた後の呼吸能 (OXPHOS) を加える前の呼吸能 (LEAK) で割った値である. ミトコンドリアに基質を加えると呼吸が始まる (LEAK) が, ATP 合成酵素の基質である ADP を加えると酸素消費速度 (呼吸能) が増大する (OXPHOS). RCR が大きいほどミトコンドリアは無傷であり, ミトコンドリア内膜に傷がありプロトンが漏れる状態では RCR は 1 になる.

腓腹筋の単離ミトコンドリアで OXPHOS, leak state の呼吸能, RCR を測定した. Complex I の RCR は complex II に比較して有意に高かった. Leak state の complex II の呼吸能は complex I に比較して有意に高かった (図 2-20).

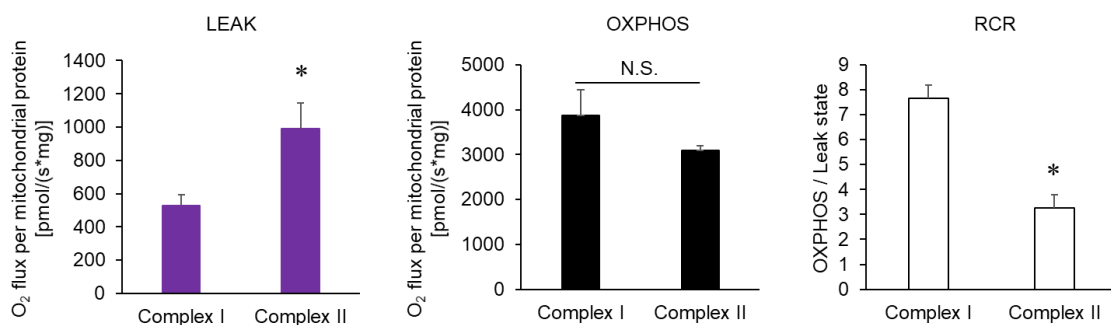


図 2-20. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能, RCR の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-4). N.S. 有意差なし, * $p < 0.05$ vs. complex I.

腓腹筋以外に、ヒラメ筋や長趾伸筋でも同様の評価をしたが、やはり complex II の OXPHOS の呼吸能は complex I の呼吸能に匹敵した。Leak state の呼吸能は complex II が有意に高く、RCR は complex I が有意に高かった (図 2-21, 2-22)。

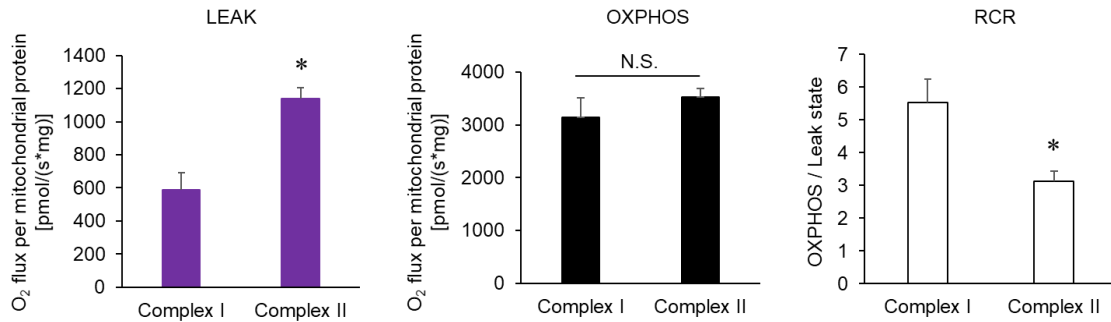


図 2-21. C57BL/6J マウスヒラメ筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能, RCR の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-4). N.S. 有意差なし, * $p < 0.05$ vs. complex I.

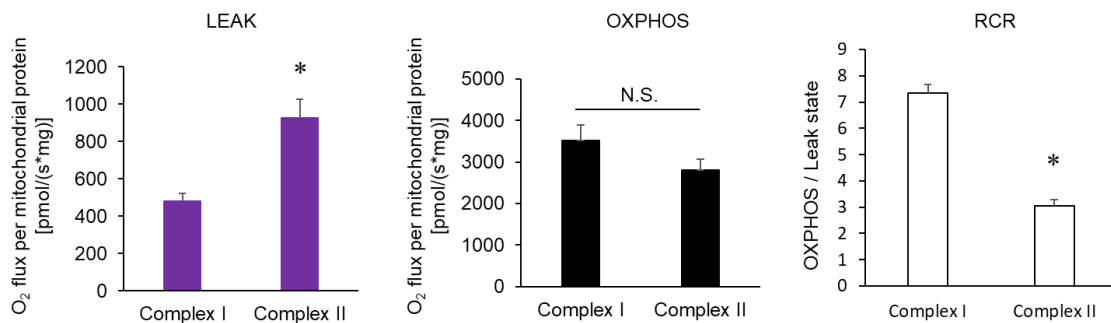


図 2-22. C57BL/6J マウス長趾伸筋ミトコンドリアにおける complex I と complex II 呼吸能, RCR の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-4). N.S. 有意差なし, * $p < 0.05$ vs. complex I.

2.2.3.4. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I の発現量と呼吸能の相関

Complex I の発現量と呼吸能との関連をみるため、complex I の発現量をブルーネイティブ法で評価した。Complex I のサブユニットである GRIM19 に対する抗体を用いて評価したところ、complex I のバンドはハシゴ状を示した。これらのバンドは complex III のサブユニット (UQCRC2) に対する抗体で評価したときにも検出できた (図 2-23) ことから、SCs に含まれる complex I を示しているものと考えた。このバンドが示す complex I の発現量は complex I の呼吸能と有意に相関した (図 2-24)。

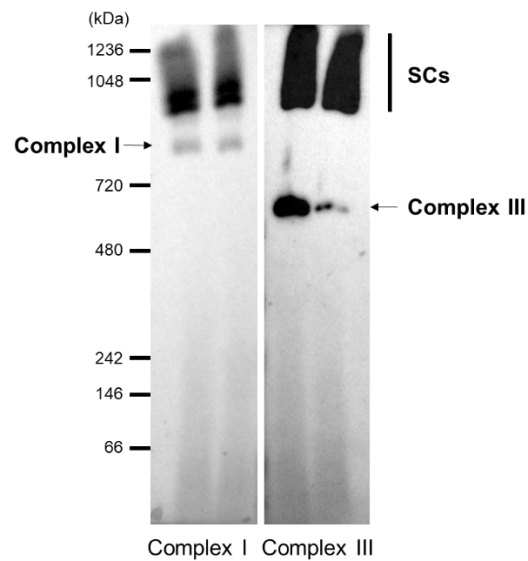


図 2-23. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおけるブルーネイティブ法による complex I と complex III の比較. n=2.

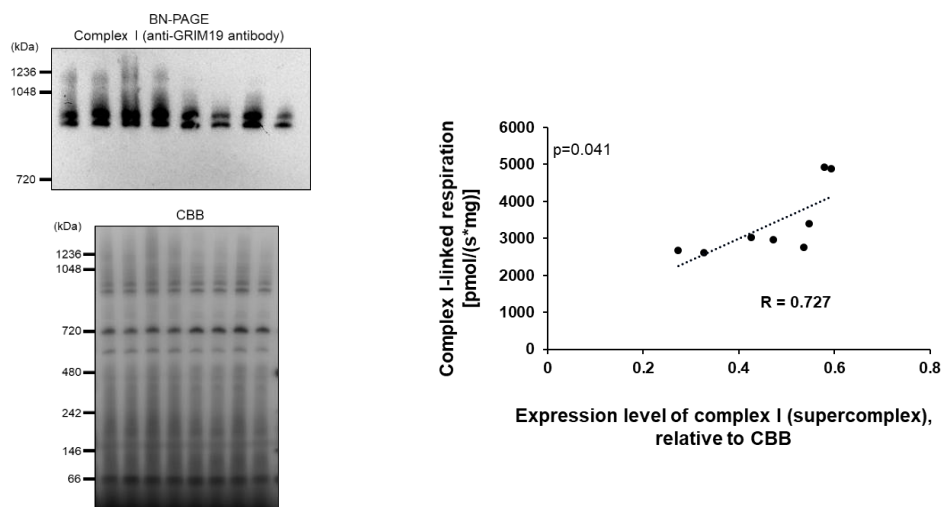


図 2-24. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアの complex I を含む SCs 発現量と complex I 呼吸能との相関。

R は相関係数 (n=8).

2.2.3.5. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I サブユニットの発現量と呼吸能の相関

一方で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価した complex I のサブユニット (GRIM19) の発現量は complex I 呼吸能と有意な相関はなかった (図 2-25).

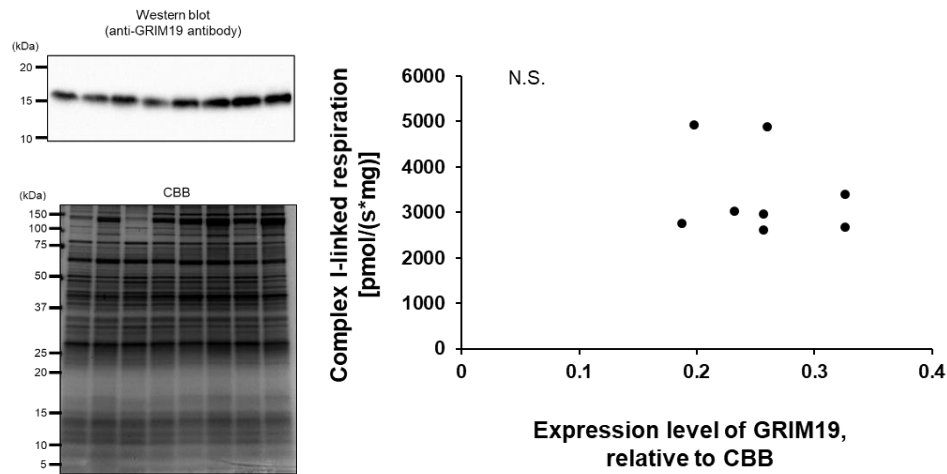


図 2-25. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアの complex I サブユニット (GRIM19) の発現量と complex I 呼吸能との相関.

R は相関係数 (n=8).

2.2.3.6. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I と complex I サブユニットの発現量の相関

また, complex I を含む SCs の発現量 (図 2-24) と complex I のサブユニット (GRIM19) の発現量 (図 2-25) に有意な相関はなかった (図 2-26).

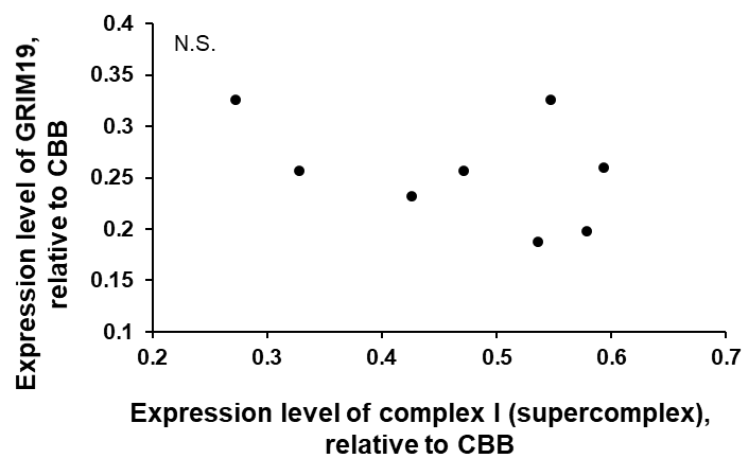


図 2-26. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアの complex I サブユニット (GRIM19) の発現量と SCs 発現量との相関.

R は相関係数 (n=8).

今回、complex Iを含むSCs発現量はcomplex Iのサブユニットの1つであるGRIM19に対する抗体を使用して評価した。これはアブカム社のデータシート(ab110412)で、ブルーネイティブ泳動法用の抗体としてこの抗体が推奨されていたからである。GRIM19が主要なサブユニットではないことから、他のサブユニット(NDUFV2, NDUFA9)に対する抗体での評価を追加した。図2-27に示すように、アクセサリサブユニットであるNDUFV2に対する抗体ではバンドの検出が困難であった。コアサブユニットであるNDUFA9の抗体ではバンドが検出され、GRIM19と同様の高さに同様なバンドがみられた。

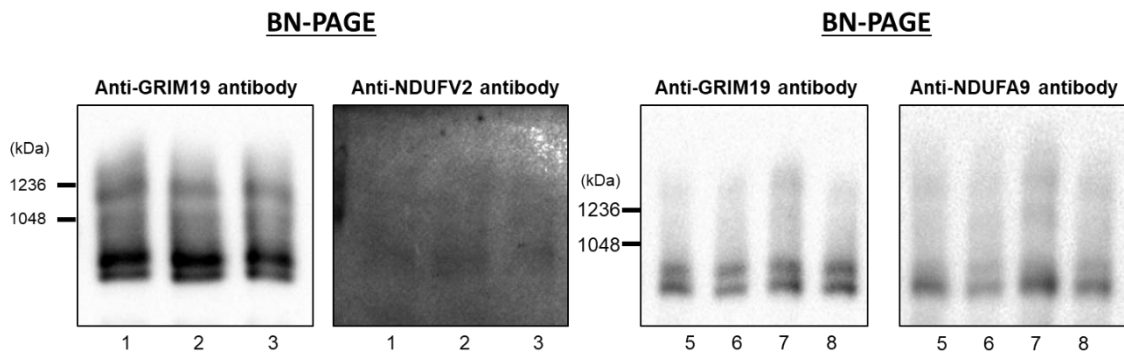


図 2-27. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex I の BN-PAGE 結果. complex I の各サブユニット (GRIM19, NDUFV2, NDUFA9) に対する抗体による評価.

2.2.3.7. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II の発現量と呼吸能の相関

次に、complex II の発現量と呼吸能の関係を評価した。Complex II の発現量は SDHA, SDHB に対する抗体を使用して評価した。SDHC, SDHD に対する抗体では明瞭なバンドが得られなかったため今回の評価には使用しなかった (図 2-13)。SDHA, SDHB どちらの抗体を使用して評価した場合でも、complex II の発現量と complex II の呼吸能は有意に相関した (図 2-28)。

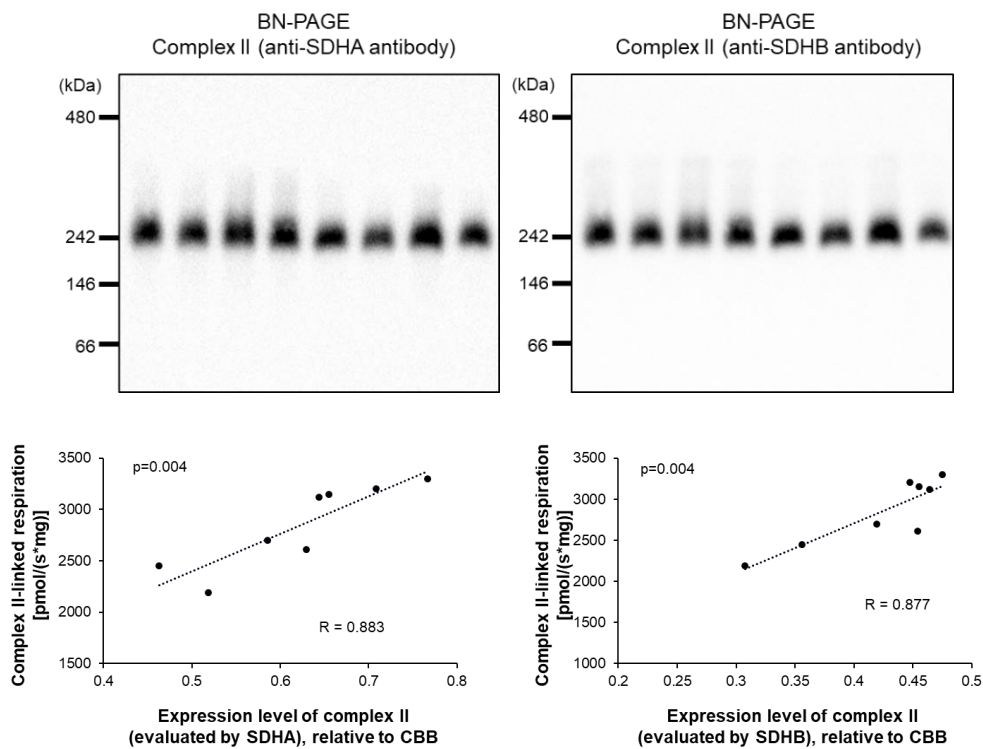


図 2-28. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II 発現量と complex II 呼吸能との相関。complex II の発現量はブルーネイティブ電気泳動法で SDHA, SDHB に対する抗体を用いて評価した。

R は相関係数 (n=8)。

2.2.3.8. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量と呼吸能の相関

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で complex II のサブユニット (SDHA, SDHB) の発現量を評価し呼吸能との相関を調べたところ, SDHA の発現量と complex II の呼吸能には相関がなかったのに対して, SDHB の発現量は呼吸能と有意に相関した (図 2-29).

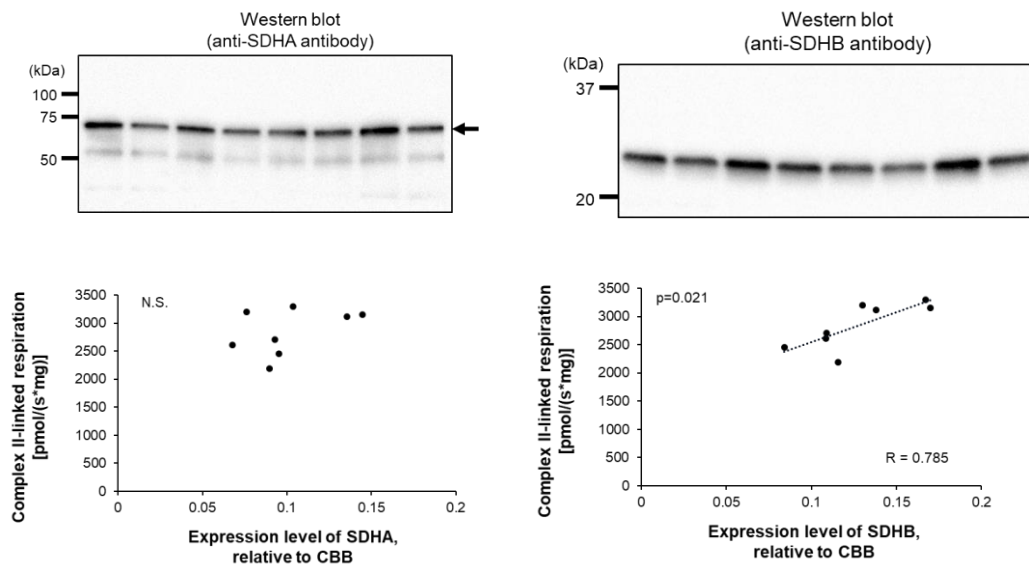


図 2-29. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量 (SDHA, SDHB) と complex II 呼吸能との相関.

R は相関係数 (n=8).

2.2.3.9. 腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II と complex II サブユニットの発現量の相関

SDHB の発現量は complex II の発現量と有意に相関したのに対し、SDHA の発現量は complex II の発現量との相関はなかった (図 2-30)。

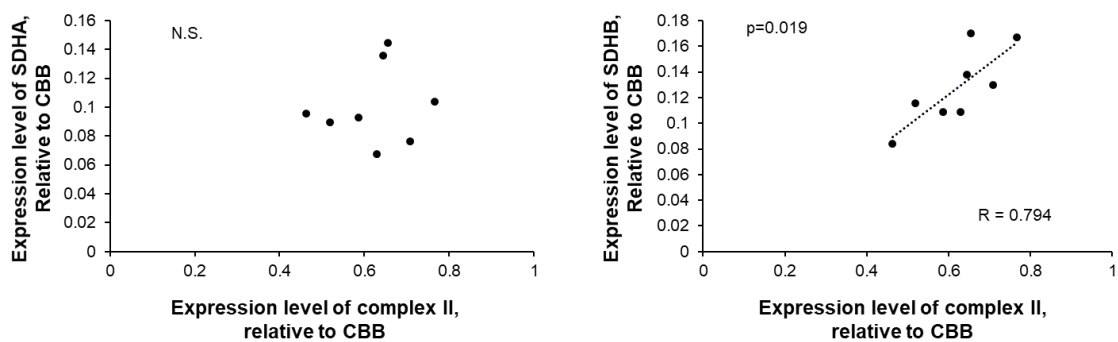


図 2-30. C57BL/6J マウス腓腹筋ミトコンドリアにおける complex II サブユニットの発現量 (SDHA, SDHB) と complex II 発現量との相関.

R は相関係数 (n=8).

2.2.4. 考察

我々が予測した通り，腓腹筋の単離ミトコンドリア，筋組織いずれにおいても心筋と同様に complex II の OXPHOS は complex I と同等であった (図 2-17, 2-18, 2-19)．ヒラメ筋，長趾伸筋の単離ミトコンドリアにおいても同様の結果であった (図 2-21, 2-22)．一方で，RCR は腓腹筋，ヒラメ筋，長趾伸筋いずれにおいても complex I が有意に高かった (図 2-20, 2-21, 2-22)．これは leak state の呼吸能が complex II が complex I よりも高いことを反映したものである．このように OXPHOS と RCR の結果は解離しており，この意義について考察した．Complex I で RCR が高いのは，個々の complex の ATP 産生効率の良さを反映している可能性がある．Complex I は SCs の一員であるのに対して complex II は SCs には含まれておらず，complex I の方が complex II よりも効率よく ATP を産生できると考えるのは合理的である．先述のように complex I: complex II のタンパク質量は 1:1.5~3 と報告されており (Capaldi et al., 1988; Hatefi, 1985; Schagger and Pfeiffer, 2001; Smith et al., 1980)，complex II はこの効率の悪さを量で代償し，結果としてミトコンドリア当たりの complex II の OXPHOS は complex I に匹敵すると考えられた．

Complex I の OXPHOS は SCs に含まれる complex I の発現量，すなわち SCs の量と相関し (図 2-24)，complex I のサブユニット (GRIM19) の発現量とは相関しなかった (図 2-25)．このことから，complex I の機能は SCs の量に規定されていると考えられた．また，SCs の発現量と complex I のサブユニット (GRIM19) の発現量との間に相関はなく (図 2-26)，SCs の発現量は complex I のサブユニットの発現量以外の因子により規定されていることが示唆された．本研究ではブルーネイティブ法で complex I を評価する際に GRIM19 に対する抗体を使用した．GRIM19 に対する抗体は，アブカム社によりブルーネイティブ法で使用する抗体として推奨されているためこの抗体を選択した．理論的には，ブルーネイティブ法では complex I の複合体を評価しており，どのサブユニットに対する抗体を使用しても同様の結果が得られるはずである．図 2-27 に示したように，コアサブユニットである NDUFA9 に対する抗体を使用した評価では GRIM19 に対する抗体と同様のバンドが得られた．一方で，NDUFV2 の抗体ではバンドが検出できず，ブルーネイティブ法では立体構造の性質上検出にくい抗体があるものと考えられた．GRIM19 に対する抗体による評価は妥当であると考えられた．

Complex II の OXPHOS は complex II の発現量と相関した (図 2-28) ことから，サブユニットが会合し complex II を形成することが complex II の正常な機能には必要であると考えられた．Complex II の OXPHOS は complex II サブユニットの 1 つである SDHB の発現量とは相関したものの SDHA の発現量とは相関しなかった

(図 2-29). また, SDHB の発現量は complex II の発現量と相関したのに対し, SDHA の発現量とは相関しなかった (図 2-30). これらの結果から, SDHA と SDHB のミトコンドリア内の挙動が異なることが示唆された. すなわち, SDHA と SDHB それぞれのタンパク質のミトコンドリア内全体の発現量のうち complex II に含まれる割合は SDHA の方が低く, SDHA はフリーで存在したり, 他の複合体に含まれる割合が高い可能性が考えられた. 実際に, SDHA は ATP 感受性カリウムチャネルの構成要素であることが報告されている(Hoekstra and Bayley, 2013).

これらの結果から, 骨格筋のミトコンドリア機能評価の際には complex I だけでなく complex II の機能の評価することも重要であると言える. また, SCs や complex II の会合不全がミトコンドリア機能低下に関与しているかどうかを評価することも今後の重要な課題である.

第3章

実験3：心筋梗塞後心不全マウスの心筋ミトコンドリア complex II 機能，サブユニット，会合因子の発現と complex II 会合の経時的変化に関する研究

3.1. 緒言

心不全の心筋ミトコンドリア機能が低下することはこれまでに数多く報告されてきたが，その多くは complex I の機能や構造に着目したものである(Garnier et al., 2003; Rosca and Hoppel, 2009; Sharov et al., 1998; Sharov et al., 2000). Complex II は SCs に含まれていないこともあり，complex II に関する研究は少ないのが現状である．しかし，実験1で示したように心筋ミトコンドリアにおいて，complex II はミトコンドリアの ATP 産生にとって大きな役割を果たしており，complex II の機能を評価することは重要と言える．また，心不全において complex II の機能が低下することは報告されている(Rosca et al., 2008; Stride et al., 2013)が，そのメカニズムや制御方法は不明であり，治療法も皆無である．そこで，我々は心不全における complex II 機能低下の原因を明らかにすることを目的とし，心不全モデルマウスの心筋ミトコンドリア complex II の機能を経時的に評価した．

Complex II は先述した通り（第2章 2.1.1.），SDHA，SDHB，SDHC，SDHD の4つのサブユニットタンパク質が結合した複合体であり，complex II が正常に機能するためにはこの複合体が正確につくられることが必要であると推測される．そこで，complex II がミトコンドリア内外でどのように構成されるかを調べ，Kim らの報告(Kim and Winge, 2013)を基に図 3-1 に示した．Complex II のサブユニット

(SDHA，SDHB，SDHC，SDHD) はいずれも核 DNA によりコードされるタンパク質であり，最初は細胞質に存在する．これらはミトコンドリア外膜，内膜に存在するトランスロケーターTIM，TOM 複合体によってマトリックス内へ輸送される．SDHA は会合因子の1つである AF2 (Assemble factor 2) の助けを借り FAD (flavin adenine dinucleotide) と結合するが，FAD は周囲の酸素と反応して活性酸素を産生しやすいため AF4 がこれを覆うように存在する．一方，SDHB は鉄硫黄クラスターと結合するが，酸素暴露により Fe^{2+} の cluster は酸化されて不安定な Fe^{3+} の状態となるため，これを防ぐために AF1 や AF3 がこれらをカバーする働きをする．マトリックス内で結合した SDHA と SDHB は内膜上に存在する SDHC や SDHD と結合して complex II が完成する．このように complex II が正常に会合するためには，complex II サブユニットの他，4種類の会合因子が必要である．

実験3では complex II の機能，発現量と，それらに大きく影響を及ぼすことが予測されるサブユニットや会合因子の発現量を経時的に評価した．

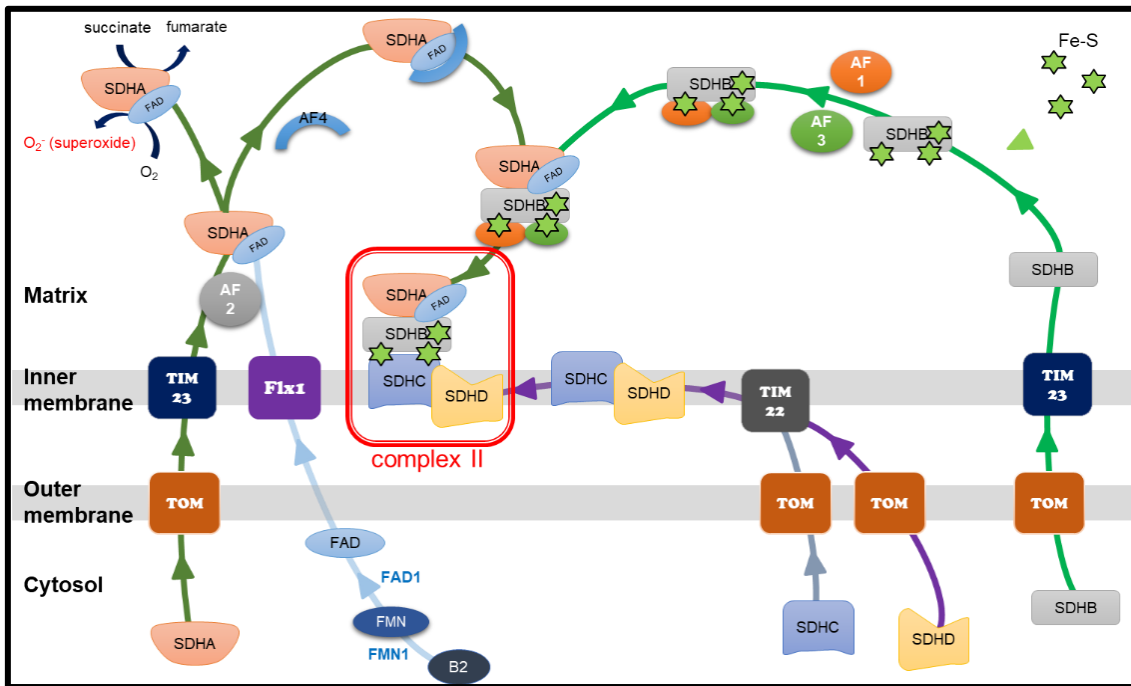


図 3-1. ミトコンドリア complex II の会合モデル

3.2. 方法

3.2.1. 心不全モデルマウスの作製

雄 10~12 週齢の C57BL/6J マウス (体重 23~26 g) の心臓の左冠動脈を結紮して心筋梗塞 (MI) を作成した。術前にマウスの体重を測定し、塩酸メドトメジン 0.3 mg/kg BW, ミダゾラム 4.0 mg/kg BW, 酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg BW の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し(Kawai et al., 2011), 十分な麻酔深度になったことを確認した。手術台に臥位で四肢と尾をテープで固定し, 気管挿管のために切歯を絹糸で牽引し頸部を進展位で固定した。頸部正中より皮膚切開の後に, 顎下腺と気管前筋を展開し, 気管の直線形状を保ちながら 23 ゲージのポリエチレンチューブが半透明の気管軟骨を通過することを直視下で確認した。その後, 従量式実験動物人工呼吸器に接続し, 毎回 110 回, 1 回換気量 0.4 ml で人工呼吸を開始し, 送気時に前胸部が良好に挙上していることを確認した。

70%アルコールで消毒を行い, 実体顕微鏡下で手術を行った。左前胸部を皮切した後に, 大胸筋と小胸筋を牽引して温存し, 肋間筋を露出した。第 4 肋間で肋間筋を切開した後に開胸器で視野を展開して心臓を確認した (図 3-2A)。心膜を切開した後に心臓を半時計方向に旋回させて左冠動脈の走行を確認し, 左心耳下縁から 0.5 mm 程度遠位で 8-0 シルク縫合糸を使用して器械結びを行った (図 3-2B)。冠動脈結紮後に結紮部遠位の心筋が赤から白色へ色調変化を確認することで, MI の作成を確認した。4-0 シルク縫合糸で閉創し (図 3-2C) 手術を終了した。コントロール群のマウスには Sham 手術を施した。これは上記一連の手技から左冠動脈結紮術を除いた処置を行った。

術後は麻酔からの回復が得られるまで 37°Cの保温パッドで保温を継続しながら待機した。抜管までの時間は, 十分に覚醒して自発呼吸が安定して再開し, 術後の急性期死亡が少ない 4 時間とした。手術時間は 10-15 分, 開胸時間は 5 分前後であった。

MI を作製したマウスを心不全 (HF) 群, sham 手術を施行したマウスをコントロール (control) 群として実験を行った。

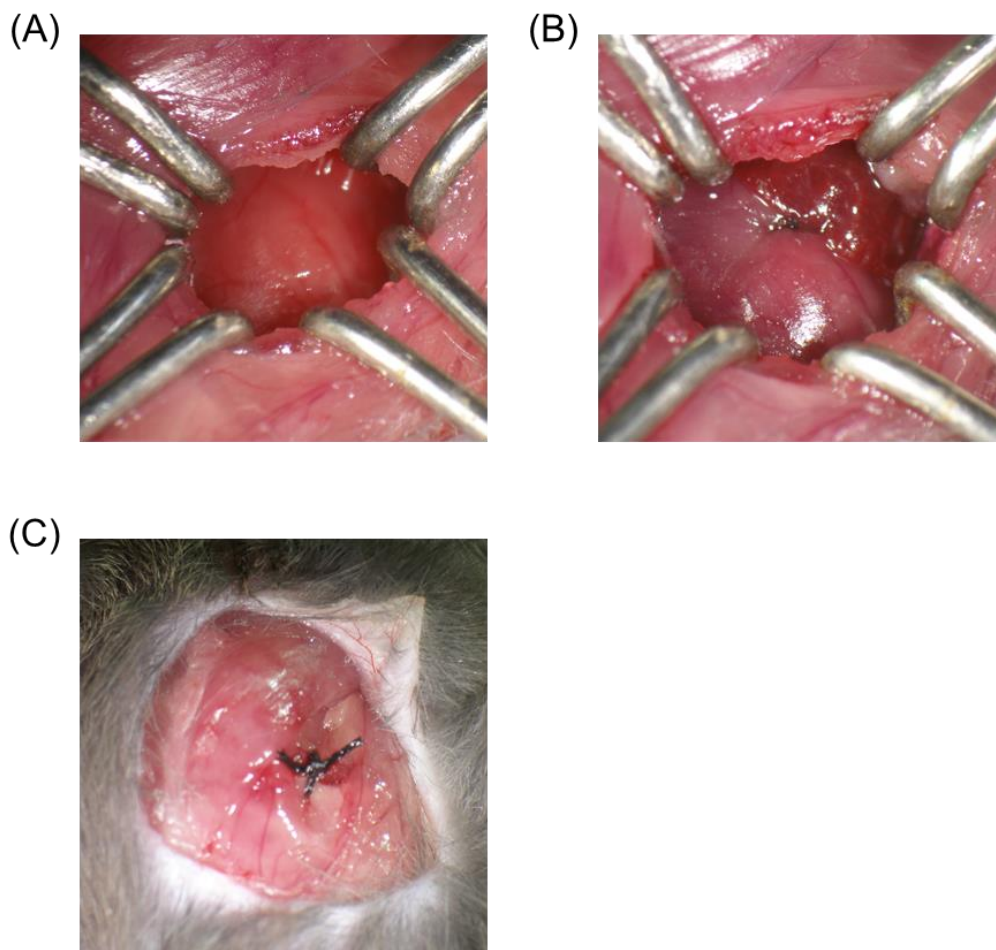


図 3-2. 心筋梗塞手術の術中写真

3.2.2. 心エコー

心エコー検査は、短時間作用型であり心抑制の少ない麻酔下（アバーチン 8 $\mu\text{l}/\text{BW g}$, 腹腔内投与）にて行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置および 12 MHz リニアプローブを用いて、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室前壁壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した（図 3-3）。

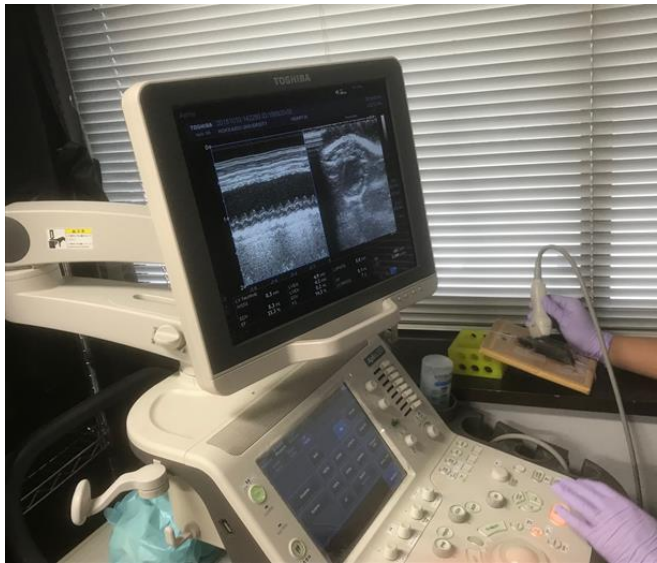


図 3-3. 心エコー検査の写真

3.2.3. ミトコンドリア単離

2.1.2.1.と同様の方法でミトコンドリアを単離した.

3.2.4. ミトコンドリアタンパク質濃度測定

2.1.2.2.と同様の方法でミトコンドリアタンパク質の濃度を測定した.

3.2.5. 心筋線維の細胞膜透過性処理

2.1.2.3.の方法に準じて心筋線維を細胞膜透過性処理した.

3.2.6. ミトコンドリア呼吸能

2.1.2.4.と同様の方法でミトコンドリアの呼吸能を測定した. 測定には単離したミトコンドリアを使用し, プロトコルに従って基質を順に加えて各ステートごとの呼吸能を評価した.

3.2.7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.1.2.5.と同様の方法で行った. コントロールとして, 下記の手法で Ponceau 染色を行いサンプル中に含まれるタンパク質量を測定した.

Ponceau 染色

- 1) タンパク質を転写したメンブレンをブロッキング装置から取り出した.
- 2) ブロッキング後のメンブレンが十分浸るようにポンソーS 染色液を注ぎ, 軽く振蕩しながら 2 分~5 分間染色した.

- 3) 染色液を捨て、メンブレンが十分浸るように1%酢酸溶液を注ぎ、バックグラウンドが十分低下しタンパク質の染色が明瞭になるまで軽く振蕩した。
- 4) メンブレンをウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで撮影した。
- 5) メンブレンが十分浸るように 0.1 M NaOH 溶液を注いだ。目視で確認しながら、タンパク質が脱色されるまで 10 秒から 20 秒程軽く振蕩した。
- 6) 0.1 M NaOH 溶液を捨て、蒸留水で 2 分間振蕩した。
- 7) 以降はウェスタンブロットのブロッキングに進んだ。

3.2.8. ブルーネイティブ電気泳動法

2.1.2.6 と同様の方法で行った。

3.2.9. ショ糖密度勾配遠心分離法

- 1) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%のショ糖を含むバッファー（1M Tris-HCl (pH 7.4), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% Triton) を各 2.55 mL ずつ、遠沈管の数だけ用意した。
- 2) まず、2.55 mL の 30%バッファーを遠沈管に入れた。次に、25%, 20%, 15%, 10%, 5%の順にバッファーをゆっくりと重層した。
- 3) その上にサンプルを乗せた。
- 4) 超遠心（186,700 g, 4°C, 24 時間）を行った。
- 5) 遠心後の溶液を上から順番に 1.25 ml ずつエッペンチューブにうつした。軽い方から 1~14 分画とした。（図 3-4）

(A)



(B)

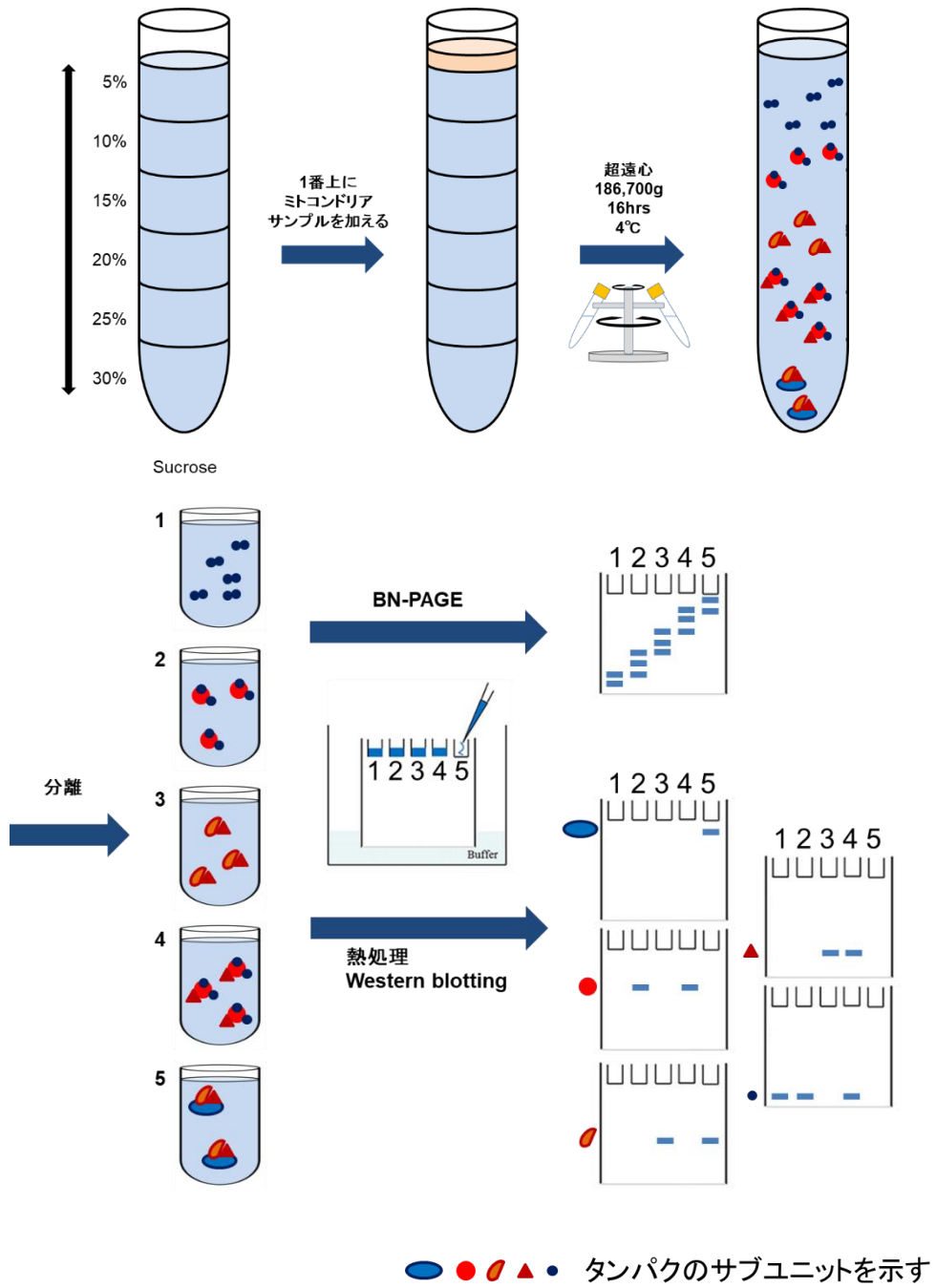


図 3-4. 超遠心機, ローターの写真 (A), ショ糖密度勾配遠心分離法の概略 (B)

3.2.10. 統計学的解析

統計処理は、GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った。 P -values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

3.3. 結果

3.3.1. 動物特性, 心エコーデータ

コントロール群と心不全群の生存曲線を図に示す (図 3-5). 心筋梗塞 3-4 週間後の心不全群の生存率はコントロール群と比較して有意に低下し, およそ 50%であった.

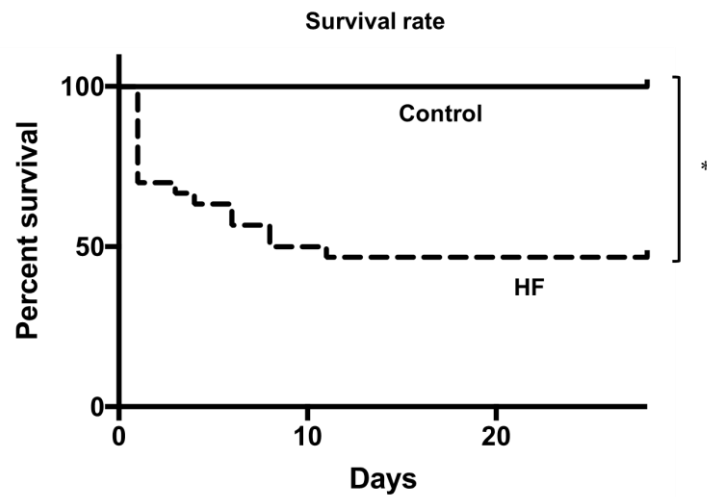


図 3-5. コントロール群と心不全群の生存率の比較

* $p < 0.05$ vs. control.

コントロール群と心不全群における体重変化と、体重当たりの肺重量、心臓重量、左室重量の変化を図 3-6 に示す。体重は両群間で有意差はなかった。肺重量、心臓、左室重量は術後 3 日後より心不全群で有意に重かった。これらのデータは心不全の発症や左室リモデリングの進行を示唆する。

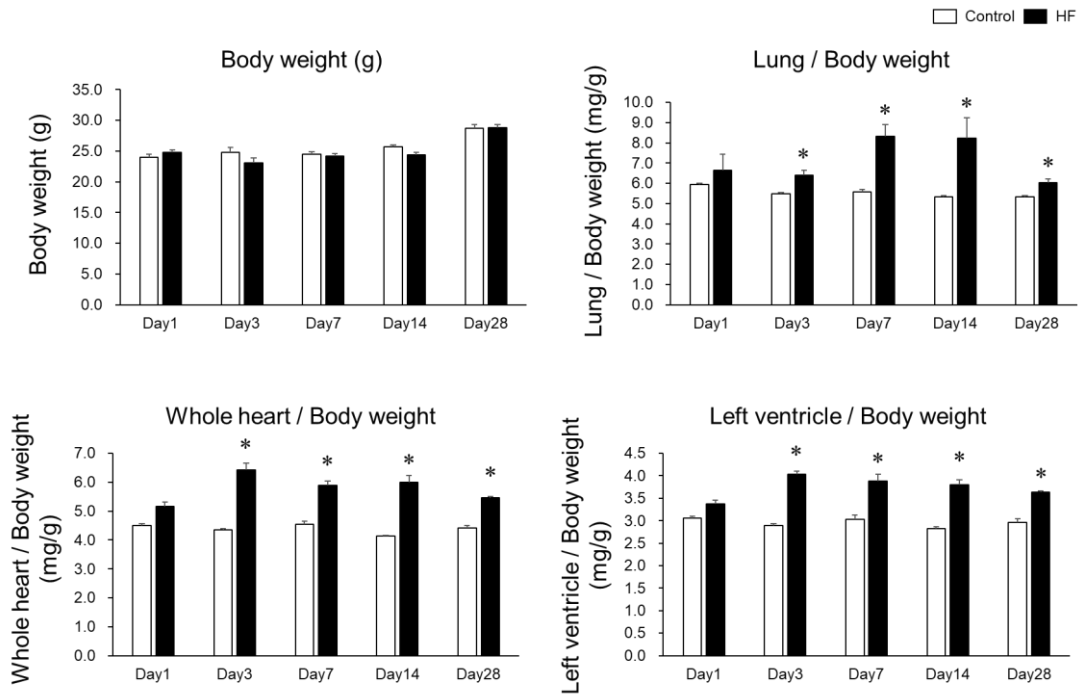
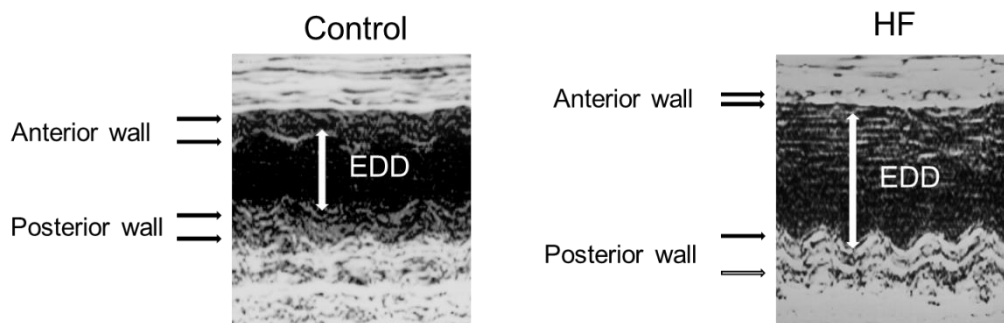


図 3-6. コントロール群と心不全群の体重と、体重当たりの臓器重量の経時的変化の比較

データは平均値±標準誤差 (n=5-8). * $p < 0.05$ vs. control.

コントロール群と心不全群におけるエコーデータの経時的変化を図3-7に示す。左室前壁は心筋梗塞発症直後から菲薄化し、後壁は心筋梗塞発症7日後から代償的に肥大した。左室内腔は心筋梗塞発症1日後から大きく、14日以降でその差がさらに顕著となった。心機能は1日後から低下し、14日以降はさらに低下した。

(A)



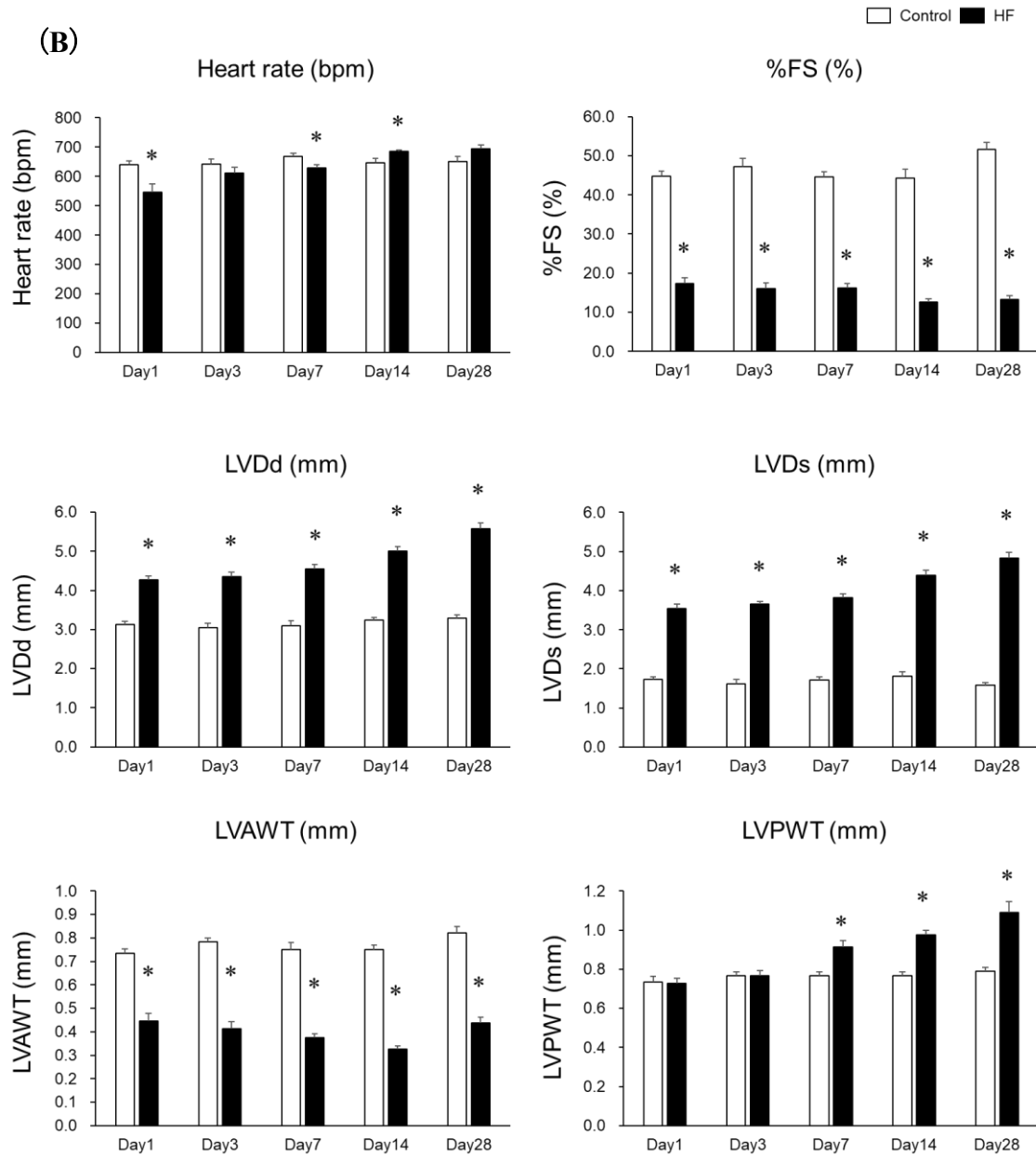


図 3-7. コントロール群と心不全群の 28 日後の代表的な心エコー画像 (A), コントロール群と心不全群のエコーデータの経時的変化の比較 (B).

データは平均値±標準誤差 (n=5-7). EDD, end-diastolic dimension; FS, fractional shortening; LVDD, left ventricle diastolic dimension; LVDs, LV systolic dimension; LVAWT, LV anterior wall thickness; LVPWT, LV posterior wall thickness. * $p < 0.05$ vs. control.

3.3.2. コントロール群, 心不全群における心筋ミトコンドリア complex II 呼吸能の経時的変化

単離ミトコンドリアを用いて complex II の呼吸能を経時的に評価した. 各時間におけるコントロール群の呼吸能を1としたときの心不全群の呼吸能を図に示した (図 3-8). 6 時間後から 28 日後までコントロール群に比較して心不全群で低下しており, 特に, 6 時間後と 28 日後は有意な低下であった.

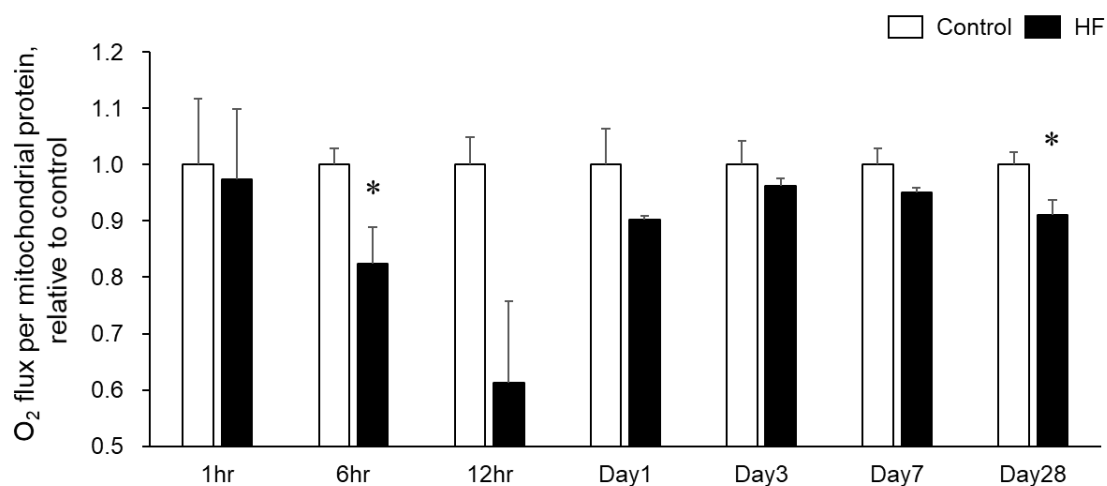


図 3-8. コントロール群と心不全群のミトコンドリア complex II 呼吸能の比較. データは平均値±標準誤差 (n=3-7). * $p < 0.05$ vs. control 群.

3.3.3. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりの complex II 呼吸能の比較 (6 時間後, 28 日後)

単離ミトコンドリア当たりで complex II の呼吸能が有意に低下した 6 時間後, 28 日後の心筋組織当たりの呼吸能を測定しコントロール群と心不全群で比較した. 心筋組織当たりの complex II 呼吸能は心不全群で有意に低下した (図 3-9).

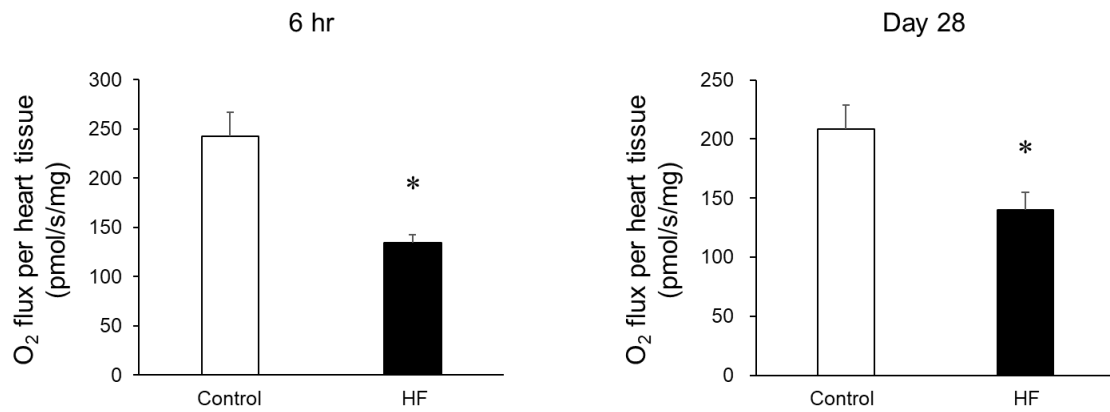


図 3-9. コントロール群と心不全群の心筋組織当たりの complex II 呼吸能の比較. データは平均値±標準誤差 (n=3-5). * $p < 0.05$ vs. control 群.

3.3.4. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりのミトコンドリア量の比較 1 (6時間後, 28日後)

心筋組織当たりのミトコンドリア量を比較するため, ミトコンドリアタンパク質のインターナルコントロールやマーカーとして使用されることの多いCOXIV (Meng et al., 2015)やTOM20(Qi and Mochly-Rosen, 2008)の組織当たりのタンパク質量を比較した. 6時間後, 28日後のいずれにおいても両群間に有意差はなかった (図3-10).

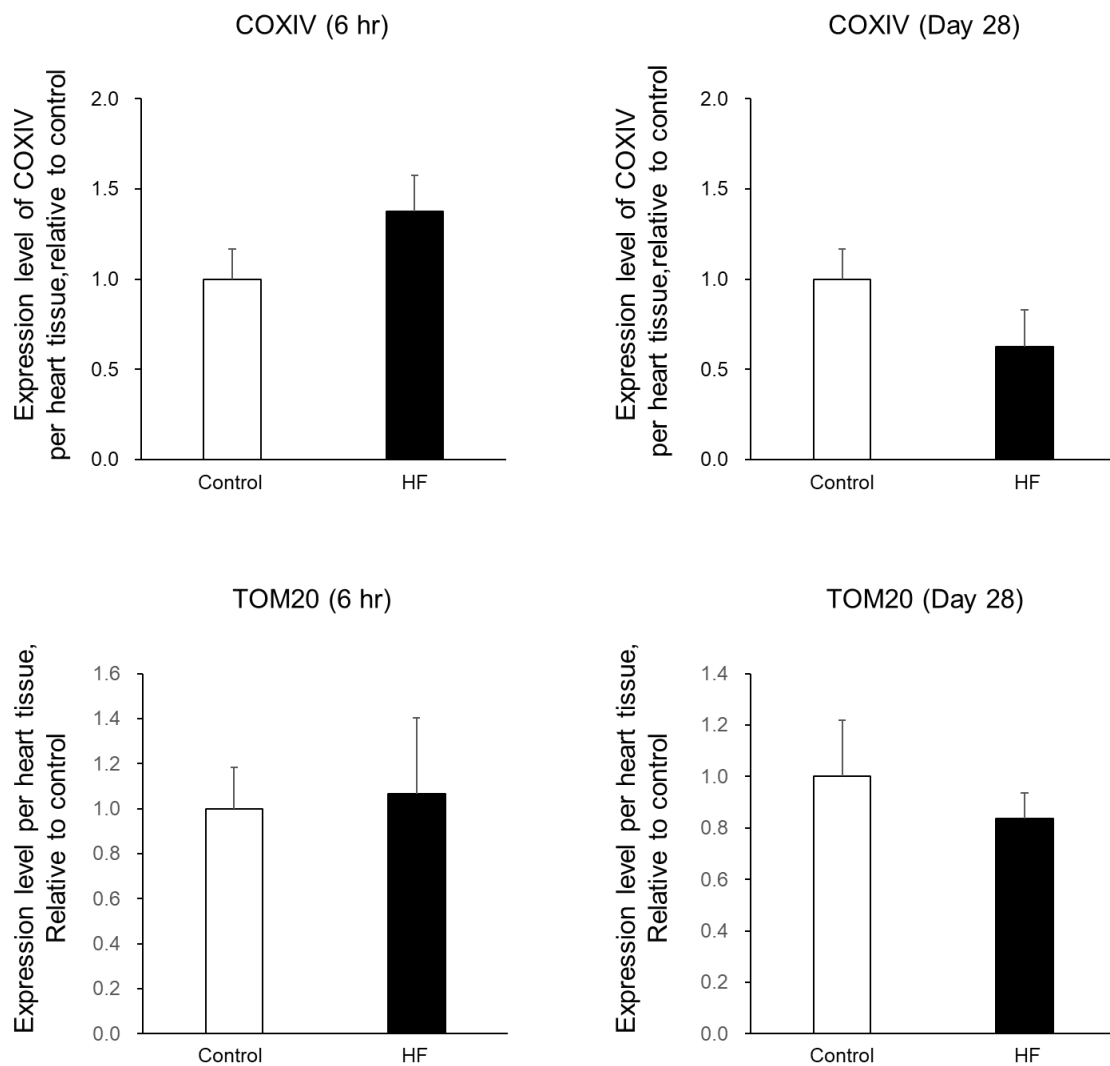


図3-10. コントロール群と心不全群の心筋組織当たりのCOXIV, TOM20の発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-5).

3.3.5. コントロール群, 心不全群における心筋組織当たりのミトコンドリア量の比較 2 (6 時間後, 28 日後)

心筋組織当たりのミトコンドリア量を比較するため, 骨格筋の研究において電子顕微鏡により評価したミトコンドリア量と相関することが報告されている complex IV の呼吸能 (ascorbate と TMPD を加えた時の呼吸能) を測定し比較した (Larsen et al., 2012). 6 時間後では両群間に有意差はなく, 28 日後では心不全群で有意に低下した (図 3-11).

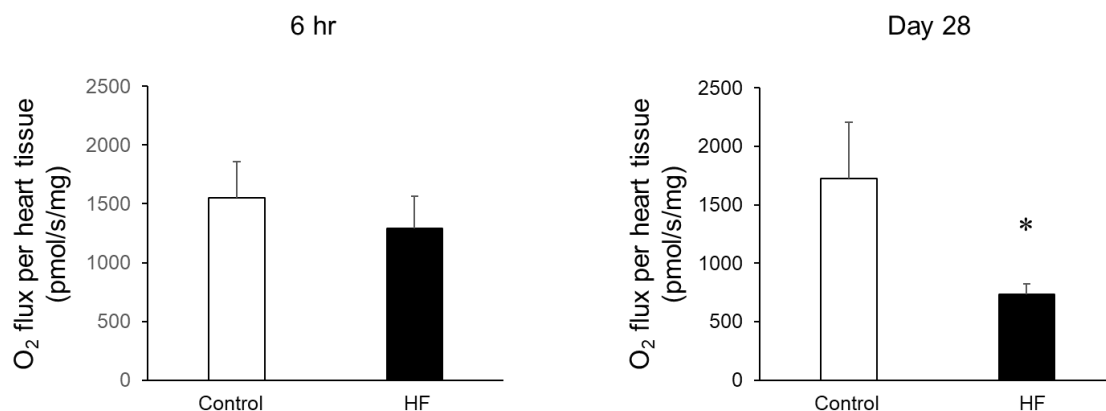


図 3-11. コントロール群と心不全群の心筋組織当たりの complex IV 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-5). * $p < 0.05$ vs. control 群.

3.3.6. コントロール群, 心不全群における complex II 発現量の比較

ミトコンドリア当たりの complex II の呼吸能が心不全群で低下していたため, ミトコンドリア当たりの complex II の発現量を比較したところ, コントロール群に比較して心不全群で低下傾向を示し, 6 時間後, 1 日後, 7 日後, 28 日後は有意に低下した (図 3-12).

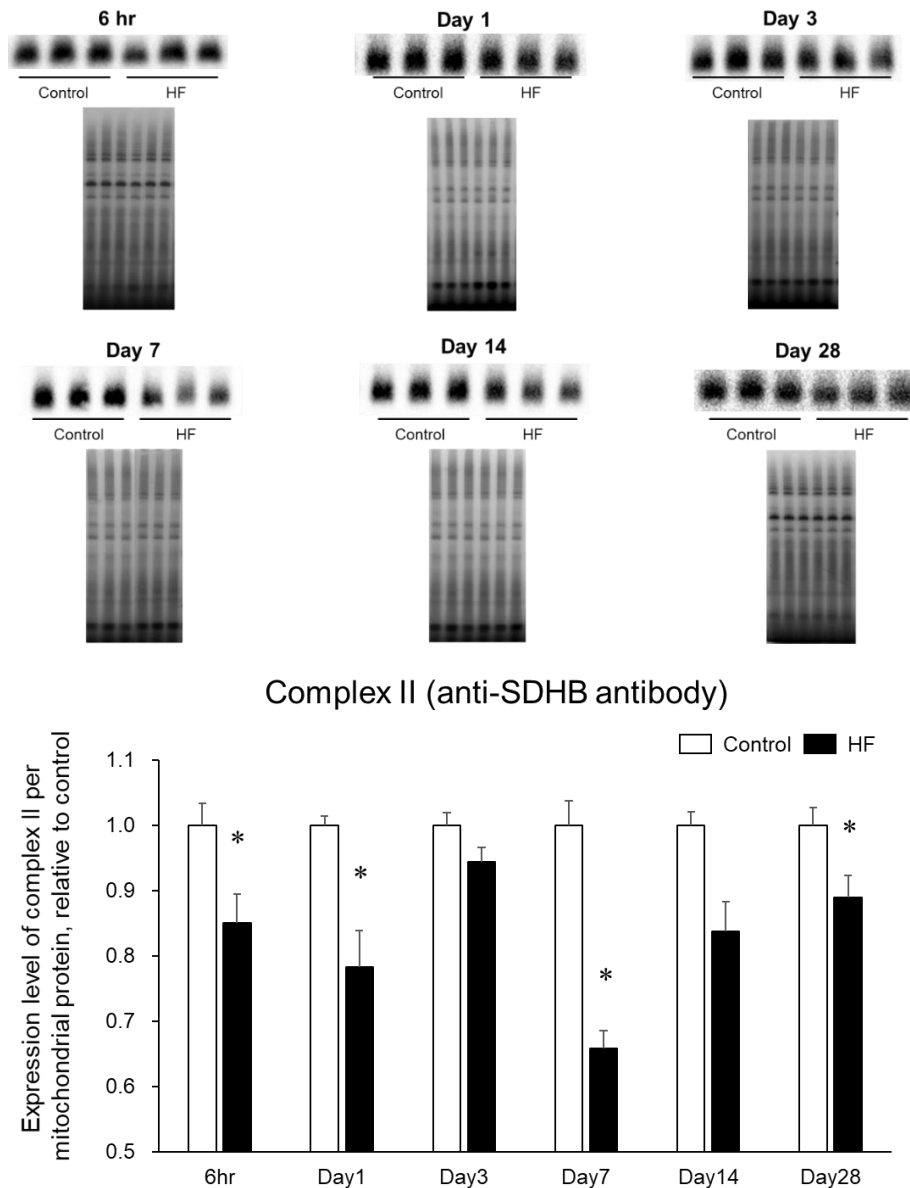


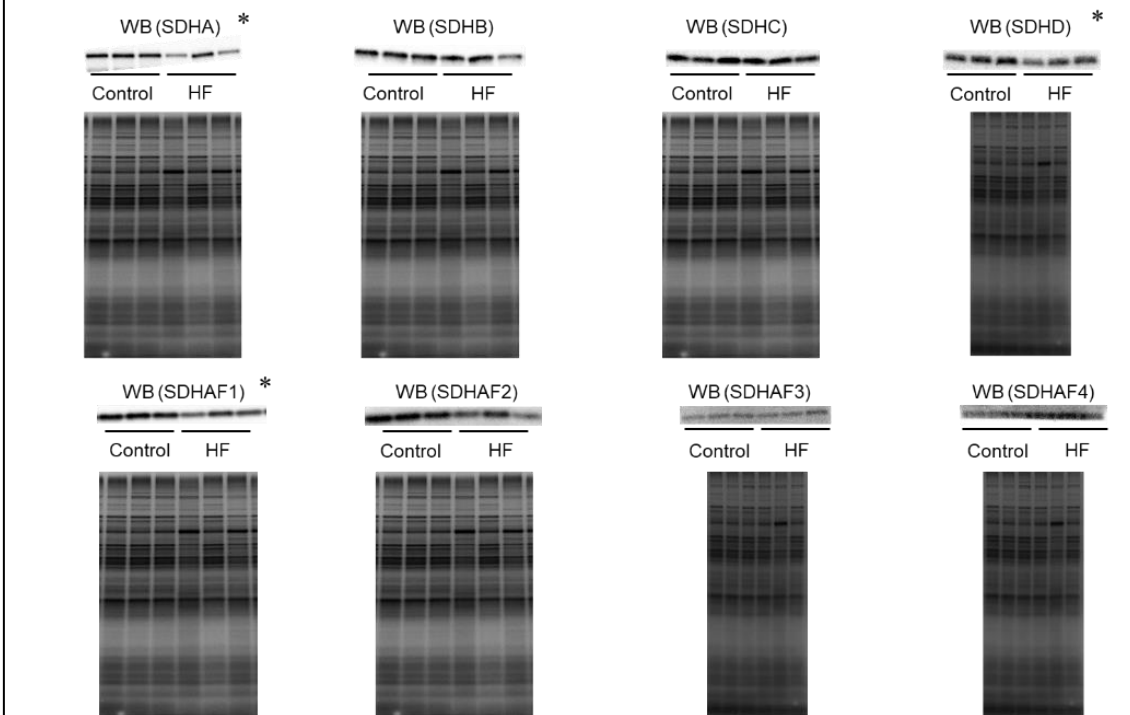
図 3-12. コントロール群と心不全群におけるミトコンドリア当たりの complex II 発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-5). * $p < 0.05$ vs. control 群.

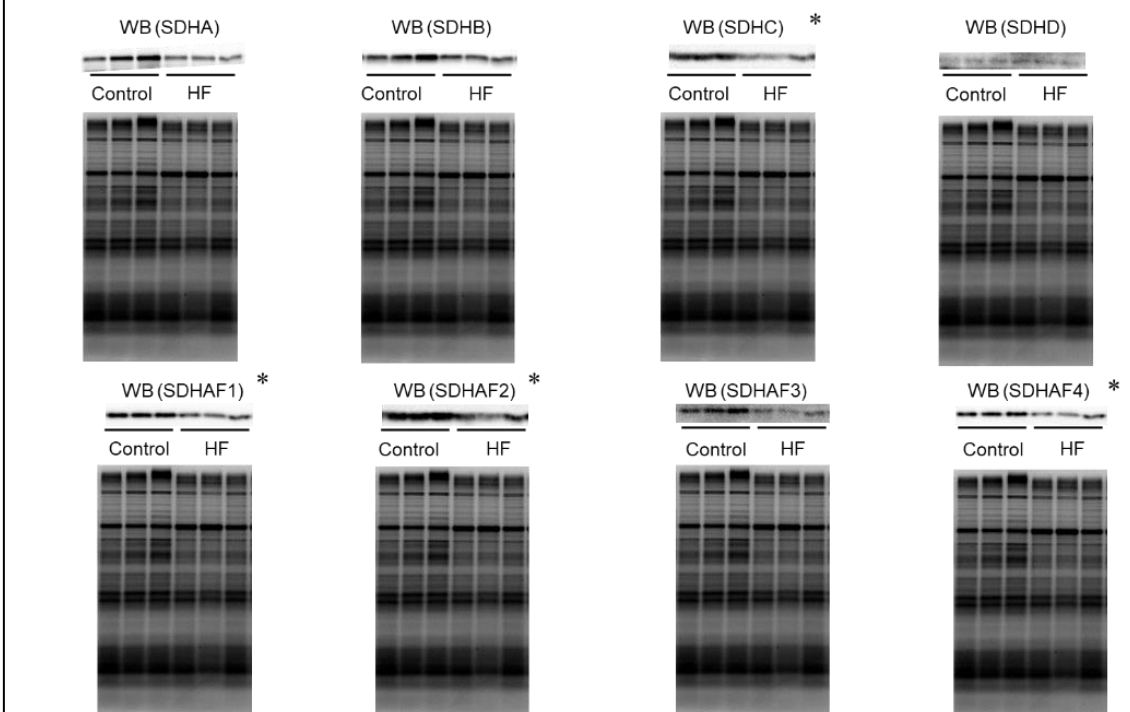
3.3.7. コントロール群, 心不全群における complex II サブユニット, 会合因子の発現量の比較

ミトコンドリア当たりの complex II の発現量が心不全群で低下したことから, complex II のサブユニット (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) や complex II の会合因子 (assembly factor : SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3, SDHAF4) のミトコンドリア当たりの発現量を比較した. 7 日後までの心筋梗塞後早期と 14 日以降の慢性期では傾向が異なっていた. すなわち, 7 日後まではサブユニットや会合因子の発現量は心不全群で低下していたのに対し, 14 日以降は心不全群での発現量の低下はなく, 有意差はないもののむしろ心不全群で高い傾向があった (図 3-13).

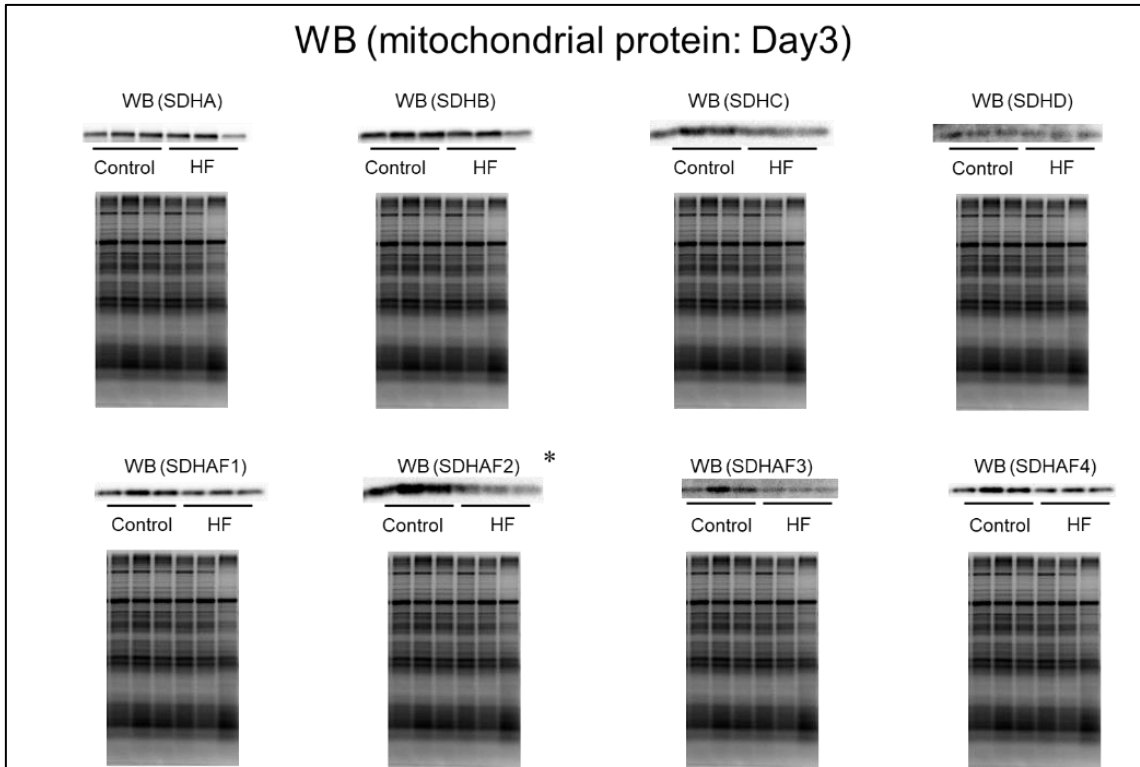
WB (mitochondrial protein: 6hr)



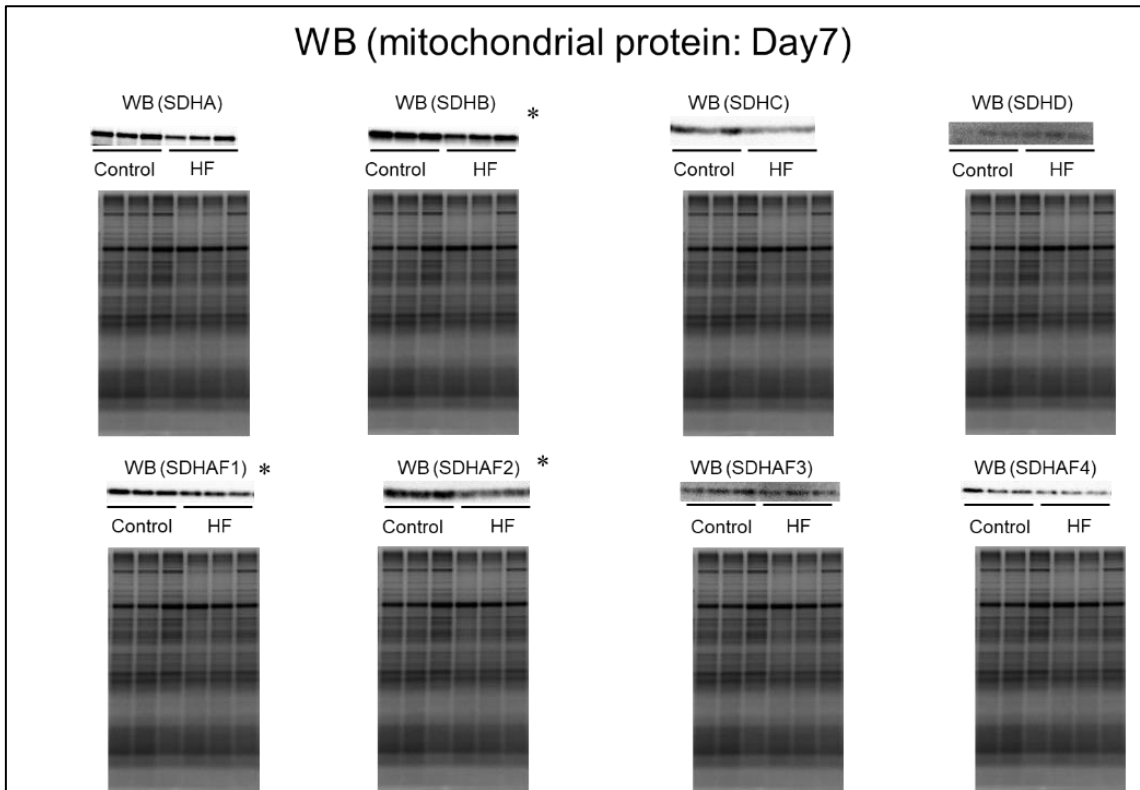
WB (mitochondrial protein: Day1)



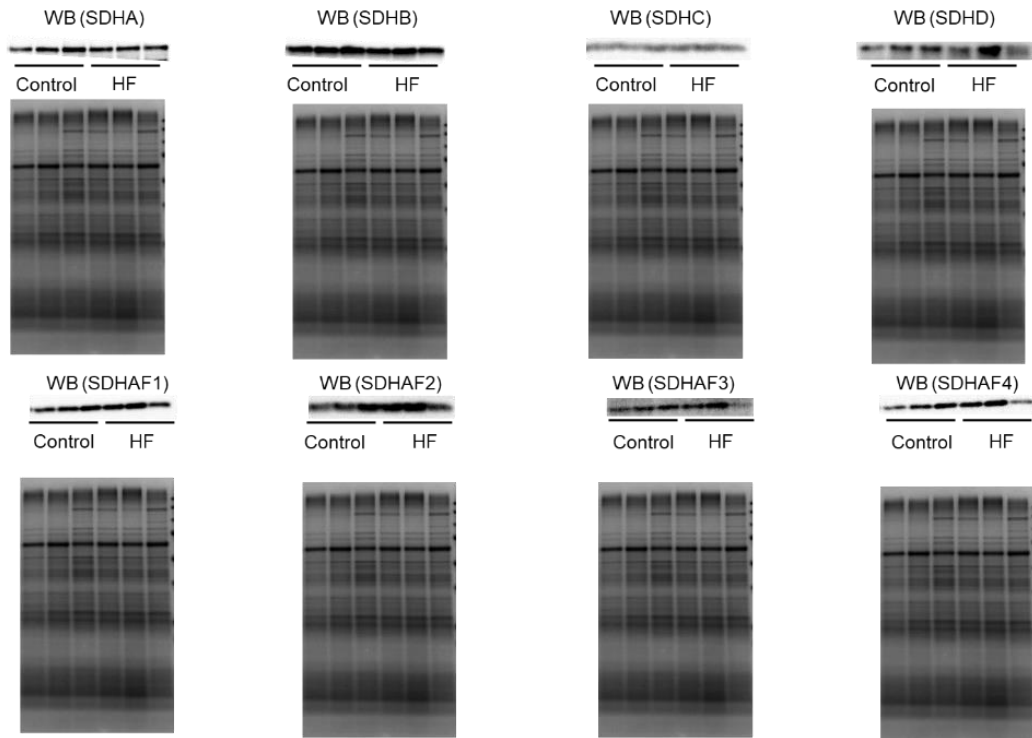
WB (mitochondrial protein: Day3)



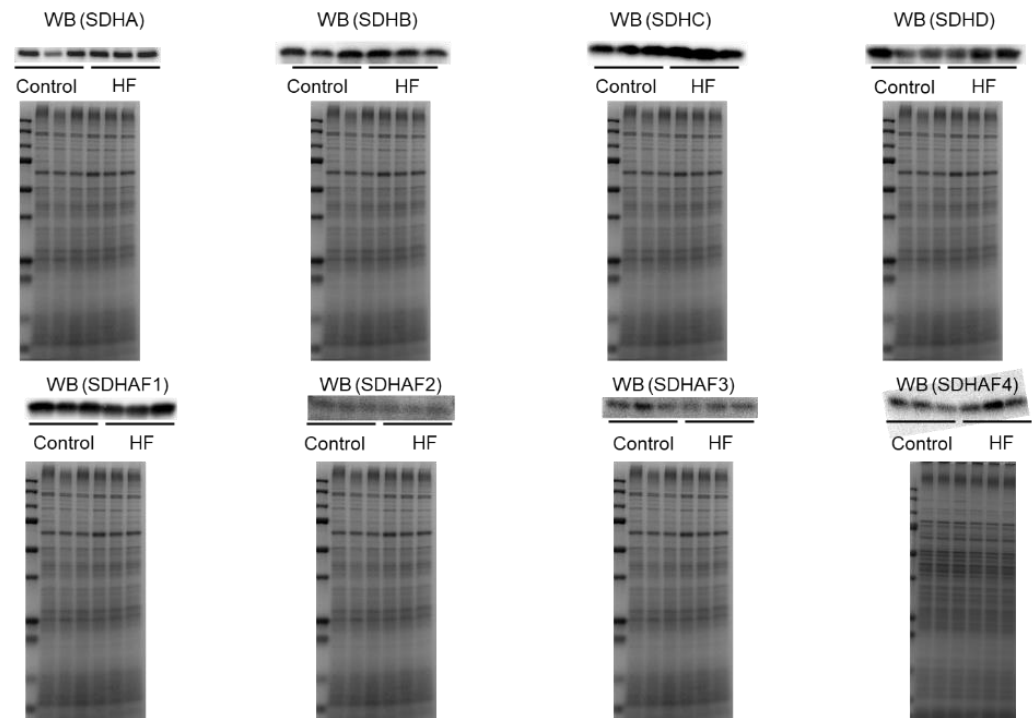
WB (mitochondrial protein: Day7)



WB (mitochondrial protein: Day14)



WB (mitochondrial protein: Day28)



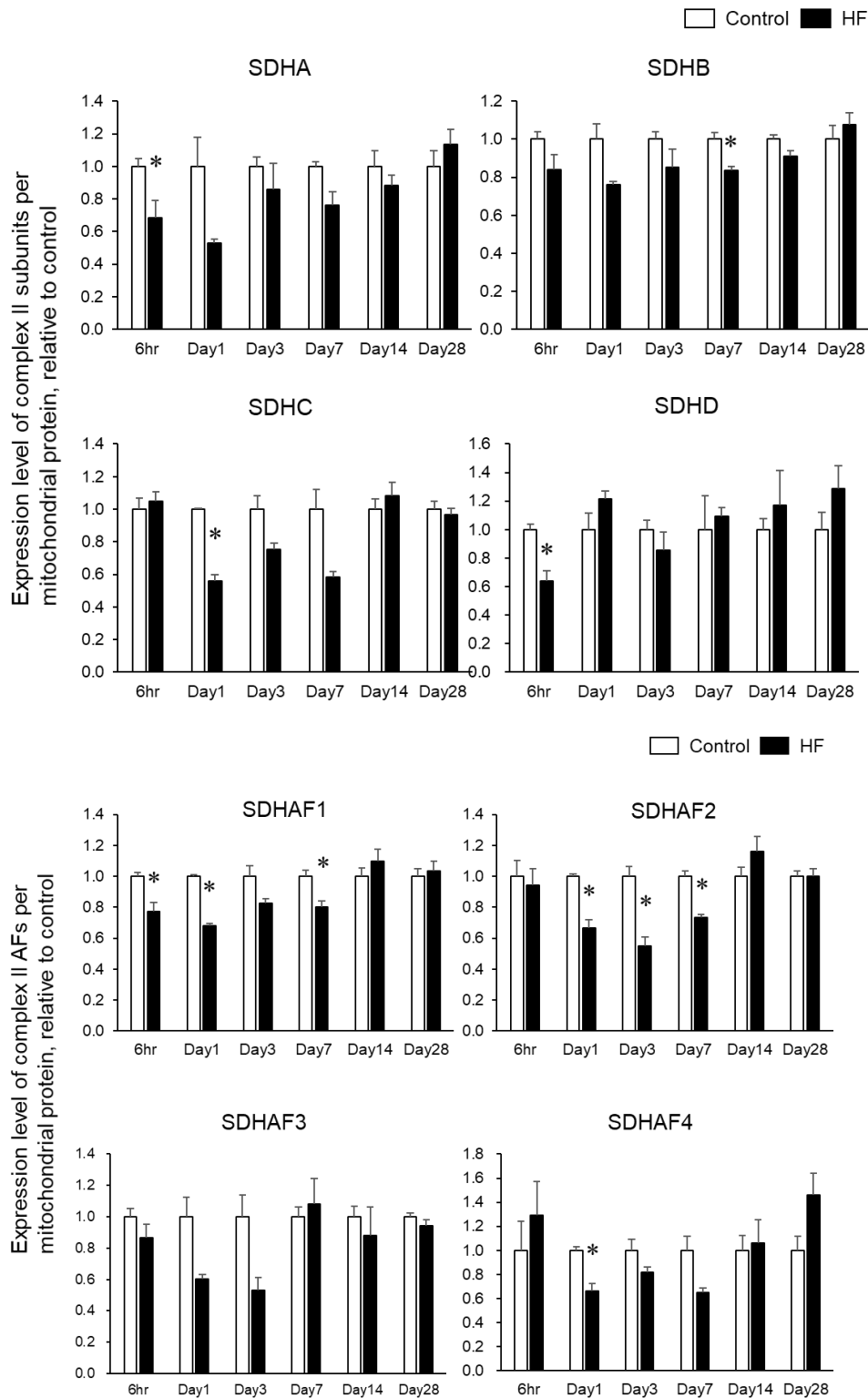


図 3-13. コントロール群と心不全群におけるミトコンドリア当たりの complex II サブユニット (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) と会合因子 (SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3, SDHAF4) の発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-10). * $p < 0.05$ vs. control 群.

3.3.8. ショ糖密度濃度勾配遠心法によるコントロール群，心不全群の complex II 発現量の比較

ブルーネイティブ電気泳動法による評価ではミトコンドリア当たりの complex II の発現量は低下していた。28 日後の発現量について，ショ糖密度勾配遠心分離法でも検証した。まず，C57BL/6J マウスの心筋ミトコンドリアを遠心分離により 14 分画に分離し，そのうち 2~14 分画のサンプルをブルーネイティブ電気泳動法により評価した。CBB 染色でタンパク質が階段状に検出され，質量により分離できていることを確認した。Complex I から V に対する抗体のカクテル (ab110412) でブロットイングしたところ，それぞれの complex が赤字で示す部分に検出された (図 3-14)。

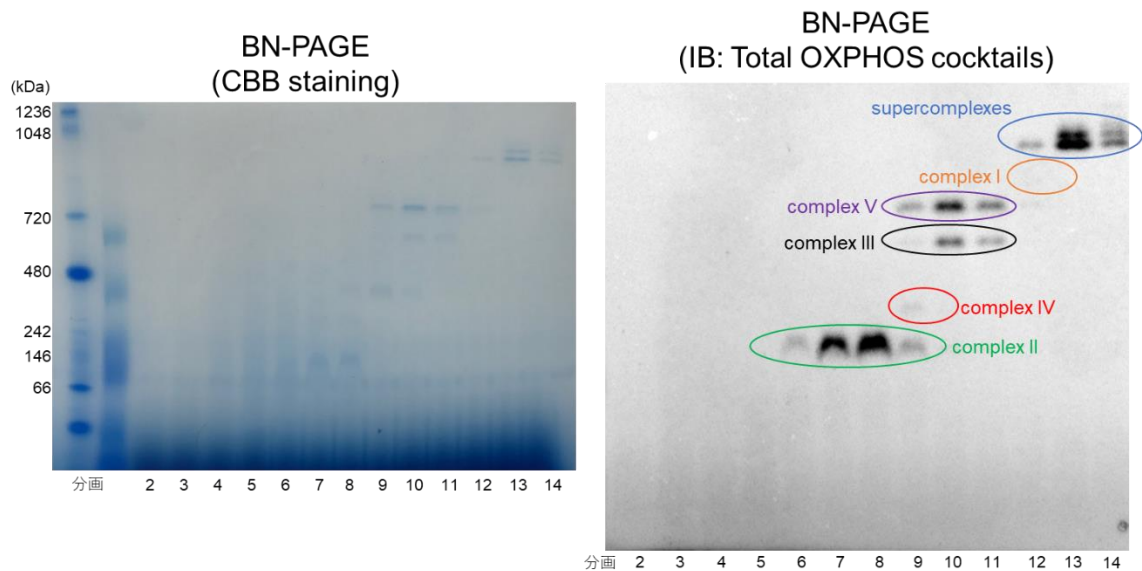


図 3-14. C57BL/6J マウスミトコンドリアタンパク質のショ糖密度勾配遠心分離法，ブルーネイティブ法による OXPHOS タンパク質の評価。

遠心分離した2~14分画をブルーネイティブ電気泳動法で泳動し、SDHB に対する抗体を用いて complex II の分布を評価したところ、complex II は主に7~9分画に存在した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりサブユニットであるSDHA、SDHB の分布を評価をしたところ、SDHB は主に7、8分画に存在したのに対して、SDHA は3から14分画に広く存在した (図 3-15)。

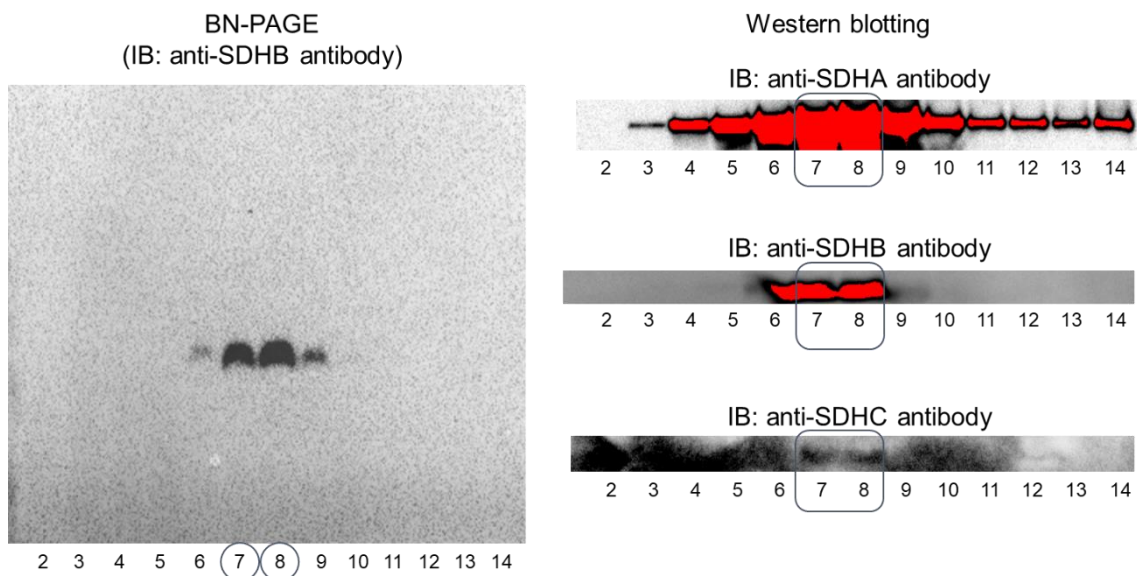


図 3-15. C57BL/6J マウスの心筋ミトコンドリアタンパク質のショ糖密度勾配遠心分離法、ブルーネイティブ電気泳動法による complex II とポリアクリルアミドゲル電気泳動法による complex II サブユニットの評価。

コントロール群，心不全群で complex II が C57BL/6J マウスと同様の分画に存在するかどうかを検証したところコントロール群，心不全群のいずれにおいても complex II は分画 7，8 に主に存在することが確認できた。また，長時間露光すると赤丸で示したように分画 5，6 に complex II よりも低い分子量のバンドが検出され，不完全な複合体と考えられた (図 3-16)。これらのことから，complex II と不完全な複合体の境目を分画 6 と 7 の間と考え，complex II は分画 7 以上に含まれると考えた。

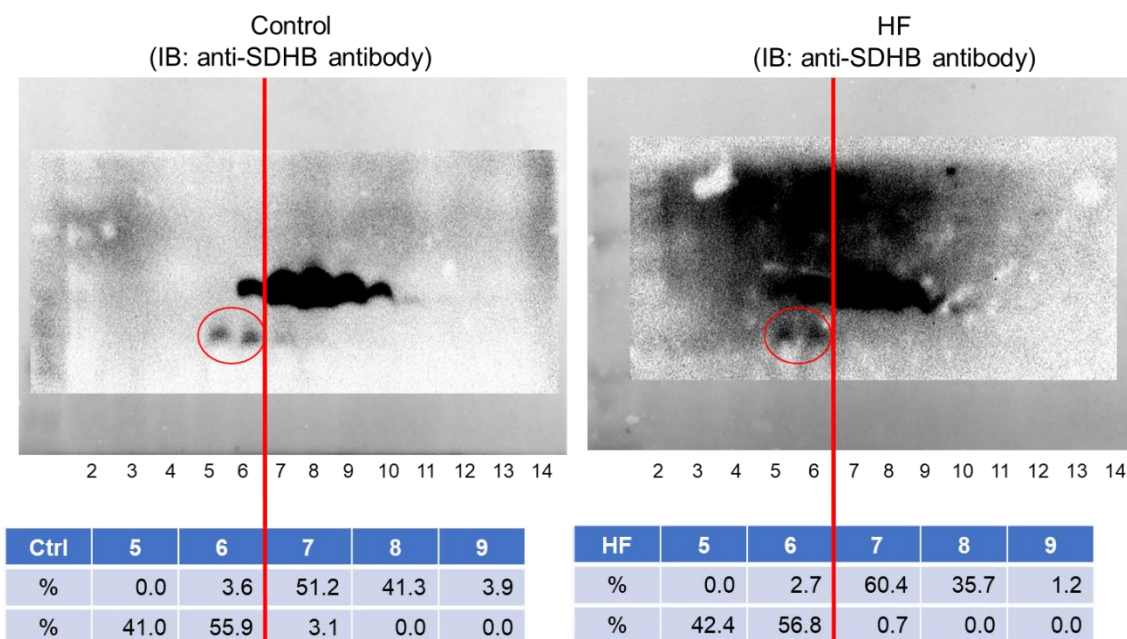


図 3-16. コントロール群，心不全群の心筋ミトコンドリアタンパク質のショ糖密度勾配遠心分離法による complex II の評価の 1 例。

分画 5, 6 の赤丸で示した部分は complex II より分子量の小さい複合体を示す。

コントロール群と心不全群で SDHB サブユニットの分布を比較した. その 1 例を図 3-17 に示した. 分画 3, 4, 11-14 では SDHB は検出されなかった. また, コントロール群に比較して, 心不全群では大きな分画に含まれる SDHB の量が少ないことが分かった.

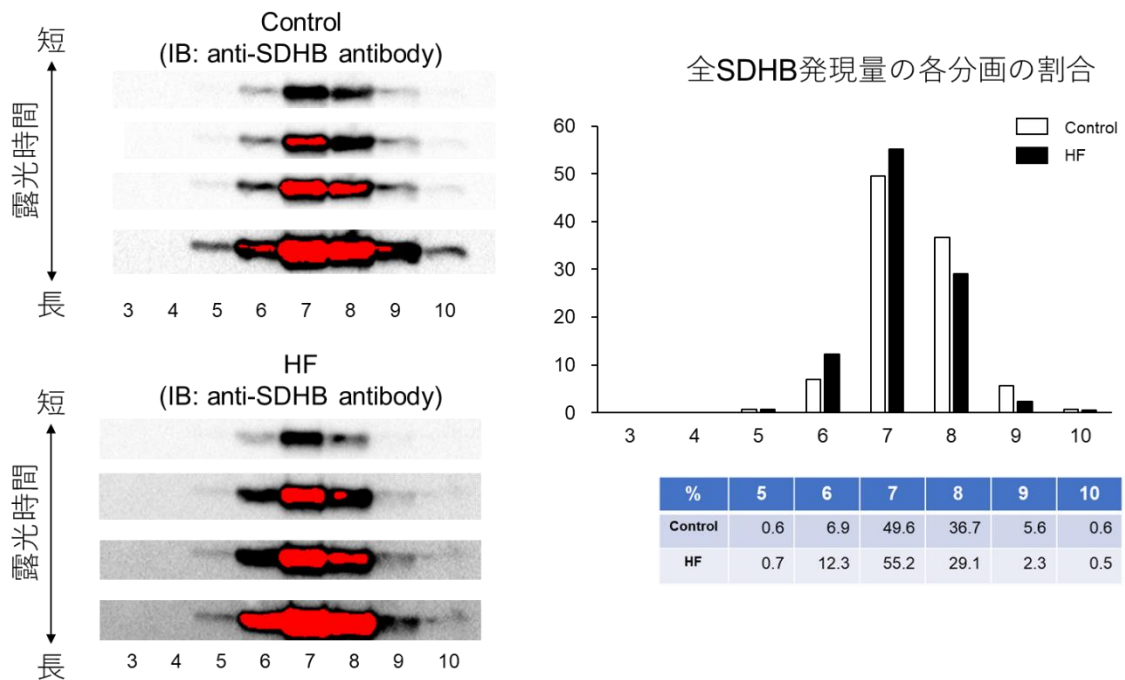


図 3-17. コントロール群, 心不全群のミトコンドリアタンパク質のショ糖密度勾配遠心分離法による SDHB の評価の 1 例.

コントロール群と心不全群での SDHB サブユニットの分布をそれぞれ n=3 ずつで比較した。図 3-18 に示すように SDHB サブユニットのうち complex II が存在する分画 7 以上に含まれる割合は心不全群で有意に低かった。このことから、SDHB のうち complex II に含まれる割合は心不全群で低いことが分かる。全体の SDHB の量が同等であることと併せて complex II の発現量は心不全群で少ないと考えられた。

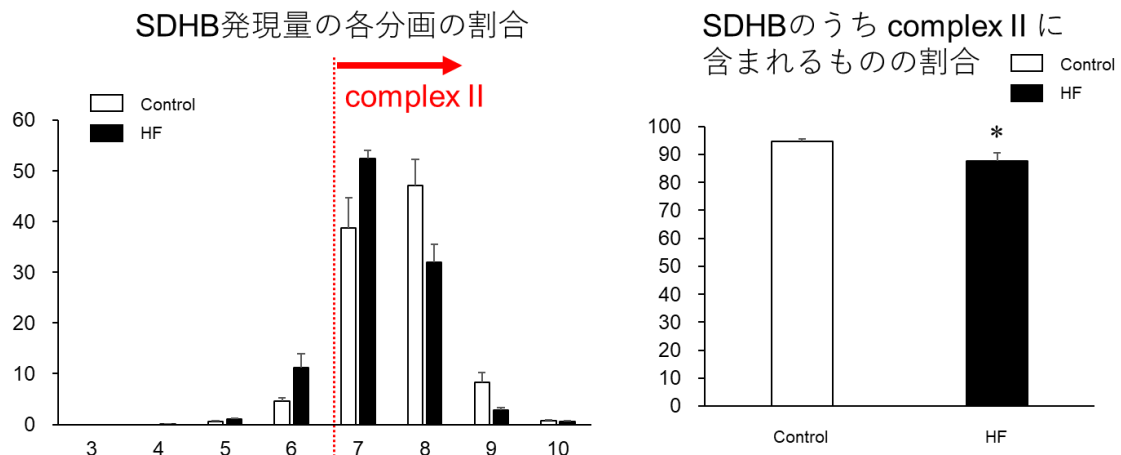


図 3-18. コントロール群と心不全群におけるシヨ糖密度濃度勾配分離法によるミトコンドリア当たりの complex II 発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3). * $p < 0.05$ vs. control 群.

3.4. 考察

冠動脈閉塞モデルは拡張型心筋症，心不全モデルとして推奨されており，通常は術後4～8週間後に心不全モデルとして使用される(Houser et al., 2012)．我々のモデルでは，3日後から肺重量，心筋重量が増加し，14日後から左室内腔が拡大，後壁が代償性に肥大し，心不全発症や左室リモデリング進行を示唆する所見であった(図3-6, 3-7)．

単離ミトコンドリア当たりの complex II 呼吸能の経時的評価では，6時間後から28日後まで心不全群で低下し(図3-8)，特に6時間後，28日後は心不全群で有意に低下した．6時間後，28日後の complex II の呼吸能は心筋組織当たりでも心不全群で有意に低下した(図3-9)．心筋組織当たりの呼吸能低下の要因にはミトコンドリアの量の低下と質の低下がある．単離ミトコンドリア当たりの呼吸能が低下していたことはミトコンドリアの質の低下を意味する．一方，ミトコンドリア量の定まった評価法はなく，正確に評価することは困難である．ミトコンドリアのマーカーやインターナルコントロールとして使用されることが多い COXIV(Meng et al., 2015)や TOM20(Qi and Mochly-Rosen, 2008)の組織当たりの発現量を比較したところ，6時間後，28日後のいずれも両群間に有意差はなかった(図3-10)．骨格筋の研究(Larsen et al., 2012)で電子顕微鏡により評価したミトコンドリア量と相関することが報告されている complex IV の心筋組織当たりの呼吸能は6時間後では有意差がなく，28日後では心不全群で有意に低下した(図3-11)．呼吸能の比較からミトコンドリア量を推測すると，28日後の心不全群における呼吸能の低下度合いは心筋組織当たりの低下度合いが単離ミトコンドリア当たりの低下度合いよりも大きく，ミトコンドリアの質だけでなく量の低下も関与していると推測される．一方，6時間後の complex II の呼吸能は心筋組織当たり，単離ミトコンドリア当たりで低下度合いは大きくは変わらず，ミトコンドリアの質の低下が主要因であると考えられる．これは complex IV 呼吸能の結果と一致するが，COXIV や TOM20 の細胞当たりの発現量の比較はこの結果とは一致しなかった．この原因として，そもそもミトコンドリア当たりの COXIV や TOM20 の発現量がコントロール群と心不全群で異なっている可能性があり，今後検討する必要がある．いずれにしても，心不全においてミトコンドリアの量が低下するということは既に報告されている(Bayeva et al., 2013)ことから我々はミトコンドリアの質の低下に焦点を絞って研究を進めた．

単離ミトコンドリア当たりの complex II の発現量をブルーネイティブ電気泳動法により評価したところ，心不全群で低下しており，特に6時間後，1，7，28日後は有意に低下した(図3-12)．このことから，complex II 発現量の低下がミトコンドリア当たりの complex II 呼吸能低下の一因であると考えられた．

Complex II 発現量の低下の原因を探るため、complex II サブユニットや会合因子の発現量を評価したところ、各タンパク質によって低下するタイミングはやや異なるものの、大まかには同様の傾向だった。すなわち、7日後までは心不全群で低下し、14、28日後では同等かむしろ心不全群の方が高い傾向だった（図 3-13）。このことから、7日後まではサブユニットや会合因子の発現量低下が complex II 発現量低下の一因であるが、14日以降は他の要因があることが示唆された。つまり、complex II 発現量低下の原因は心筋梗塞後の時期により変化すると考えられた。

28日後の complex II 発現量についてはショ糖密度勾配遠心分離法でも評価を試みた。遠心分離で14分画に分け、complex II が存在する分画をブルーネイティブ法により確認し、その上で complex II サブユニットの発現の分布を評価した。この方法で SDHB の分布はコントロール群と心不全群で異なっていた（図 3-18）。具体的には complex II が存在すると考えられる分画に含まれる SDHB の割合はコントロール群で有意に高かった。この結果は、ミトコンドリア全体に存在する SDHB のうち complex II を構成する SDHB の割合が心不全群で低下していることを意味する。28日後においてはサブユニットの発現量自体はコントロール群、心不全群で有意差が無かったことも併せて、complex II の発現量は心不全群で低下していると考えた。しかし、この方法には問題点がある。今回、complex II と不完全な複合体の境界を分画6と7の間にあるとしたが、分画6には complex II のバンドもみられており、正確に区分できたとは言えないのが最大の問題点である。SDHB の分布がコントロール群と心不全群で異なっていたことは大変興味深いだが、complex II の発現量の定量に関しては正確性を欠いていると言わざるを得ない。

実験3において complex II 発現量が心不全群で低下した原因が7日までと14日以降で異なることが示唆されたため、心筋梗塞後早期（6時間後）と慢性期（28日後）の2つの時期に分けて complex II 呼吸能が低下するそれぞれの原因を明らかにすることを目的として実験4（早期）、5-6（慢性期）を行った。

第4章

実験4：心筋梗塞後早期における心筋ミトコンドリア complex II 機能低下についての研究

4.1. 緒言

実験3（第3章）で、心筋梗塞後6時間後の心筋ミトコンドリアにおいてミトコンドリア当たりの complex II の発現量、呼吸能は有意に低下した。Complex II の発現量が低下する原因を考え、図4-1に図示した。実際のミトコンドリア内では、図の左に示した各サブユニット単独で存在する状態と図の右に示した complex II を会合した状態が混在しているものと考えられる。会合した complex II の発現量が低下するのは、左から右への流れが低下する場合と、右から左への流れが亢進する場合が考えられる。左から右への流れが低下する要因としては、complex II サブユニットの発現量低下、会合因子の発現量や機能の低下がある。一方、右から左への流れが亢進する要因としては complex II の不安定化、分解亢進が考えられ、その原因として不完全な complex II がつくられることや、過剰もしくは不十分なタンパク質翻訳後修飾などが挙げられた。心筋梗塞後早期では complex II サブユニットや会合因子の発現が有意に低下することが明らかになっており、これらの発現量低下が complex II 発現量低下の要因と考えた。

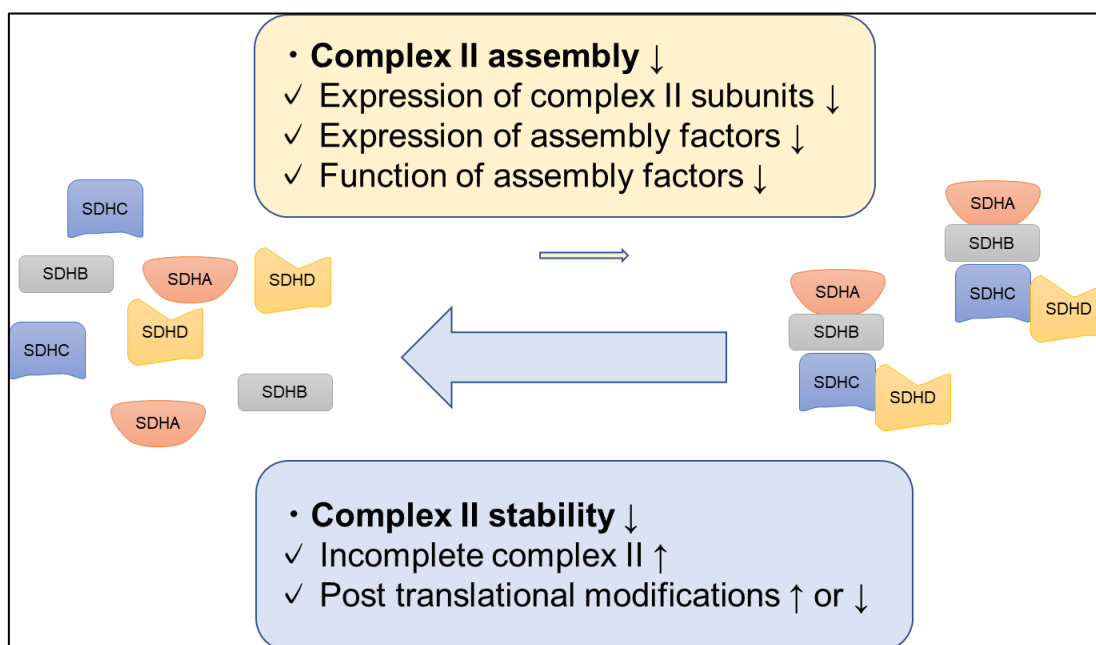


図4-1. Complex II 発現量低下の要因

また、心筋梗塞後早期に complex II サブユニット発現量が低下する原因は心筋梗塞に関連した要因として心筋の低酸素や炎症反応亢進を考えた。心筋梗塞後の心筋では梗塞部位、非梗塞部位いずれにおいても炎症反応が亢進することが報告されている(Irwin et al., 1999)。低酸素に関しては報告はないものの心筋梗塞後に心筋が低酸素に陥ると推測される。

これらのことから、本実験では、「心筋梗塞後早期に心筋の低酸素や炎症反応亢進が complex II サブユニットの発現量低下を引き起こし、その結果 complex II の発現量や機能が低下する」と仮説を立て、検証した。

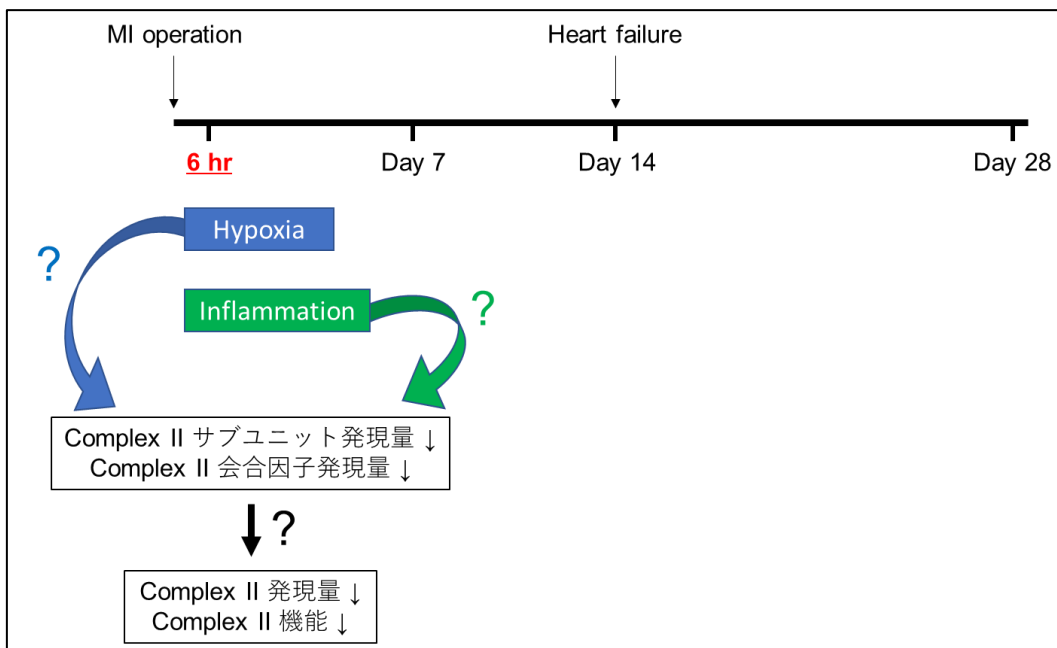


図 4-2. 実験 4 の概略

4.2. 方法

4.2.1. 心不全モデルマウスの作製

3.2.1 と同様の方法で心筋梗塞マウスを作製した。

4.2.2. 細胞培養

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞，心筋芽細胞である H9c2 細胞を 5% CO₂, 37°C に維持された CO₂ インキュベーター内で培養した (図 4-3)。全ての作業はバイオクリーンベンチ内で行った。

細胞は 10% ウシ胎児血清，1% ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地で増殖させた。



図 4-3. CO₂ インキュベーター内での細胞培養の写真

4.2.3. siRNA

- 1) トランスフェクションの前日に，C2C12 細胞を適切な濃度でプレートした (1.2×10^6 /フラスコ)
- 2) 37°C，二酸化炭素 5% で細胞を一晩培養した。
- 3) 50 ml チューブを 2 本準備し，適当量の siRNA (25~100 nM，チューブ 1) または DharmaFECT (20~60 μ l/フラスコ，チューブ 2) を，それぞれ抗生物質を含まない無血清培地で希釈した。
- 4) 2 本のチューブを注意深くピペッティングし，各チューブの内容物を穏やかに混合した。室温で 5 分間インキュベートした。
- 5) チューブ 1 の溶液をチューブ 2 に加えた。注意深くピペッティングして混合した。室温で 20 分間インキュベートした。
- 6) 抗生物質を含まない完全培地を加えてトランスフェクション用培地を調製した。

- 7) フラスコから完全培地を取り除き、10 ml のトランスフェクション用培地を加えた。37°C、二酸化炭素 5%で、細胞を 48~72 時間培養した。
- 8) 細胞を回収し、その後の実験に使用した。

4.2.4. 細胞からのタンパク質抽出

- 1) 回収した細胞を PBS で洗い、1500 rpm、5 分間遠心し、上清を破棄した。
- 2) 氷冷した 10×Cell Lysis Buffer を蒸留水で 10 倍希釈し、Complete protease inhibitor cocktail, 1 mM PMSF, PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail を添加した。上記の 1×Cell Lysis Buffer に細胞を入れ、ピペッティングし、20 分間氷上で静置した。
- 3) サンプルを遠心分離し (15,000 g, 10 分, 4°C), ペレットを捨わないように上清を新しいマイクロチューブに移した。長期保存する場合は、-80°Cで冷凍保存した。

4.2.5. 細胞からのミトコンドリア単離

Frezza らの報告(Frezza et al., 2007)を参考に細胞からミトコンドリアを単離した。

- 1) 細胞を回収し、フラスコ 1 枚当たり PBS 1 ml で細胞を溶解した。
- 2) 1500 rpm, 4°C, 5 分間遠心して上清を破棄した。
- 3) 1 ml シリンジに 27 ゲージ注射針を装着し、細胞混濁液のホモジネートを行った。
- 4) 急激にシリンジを引き、細胞混濁液がシリンジ内に入った後に強くシリンジを押し出した。これを 25~30 回繰り返した。
- 5) 得られたホモジネート溶液を 600 g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を回収して新しいエッペンチューブに移した。
- 6) 再度 600 g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を回収して新しいエッペンチューブにうつした。
- 7) 8000 g, 4°C, 10 分間遠心し、上清を破棄した。
- 8) 得られたペレットに isolation buffer 700 µl を加えて再溶解させ、8000 g, 4°C, 10 分間遠心した。
- 9) 上清を破棄し、isolation buffer 1 ml を加えてペレットを再溶解し、10,000 g, 4°C, 10 分間遠心を行い、上清を破棄し、suspension buffer で溶解し、ミトコンドリア分画を得た。

4.2.6. タンパク質濃度測定

2.1.2.2.と同様の方法でタンパク質濃度を測定した。ミトコンドリアタンパク質は波長 590 nm, whole cell lysate は 562 nm で測定した。

4.2.7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.1.2.5.と同様の方法で行った。

4.2.8. ブルーネイティブ電気泳動法

2.1.2.6.と同様の方法で行った。

4.2.9. Realtime PCR 法

組織からの RNA 抽出

QuickGene RNA Tissue kit S を用いて抽出を行った。

- 1) 深麻酔下でマウスを屠殺後、心筋を摘出し、RNAlater (Life technologies, Tokyo, Japan) に 4°C の冷蔵庫内で一晩浸した。
- 2) ハサミで細断した心筋組織を、メルカプトエタノール入りの lysis バッファー 500 µl の入ったチューブに移した。ボールミル型ホモジナイザーでホモジナイズを行うため各チューブにはあらかじめ 5 mmφ のジルコニアボールを数個入れた。
- 3) 組織はトミー精工製 Micro Smash MS-100 を用い、毎分 3,800 rpm, 300 秒で 4 回 (氷上で各インターバルは 20 秒) ホモジナイズした。
- 4) 組織破片を分離除去するため ≥17,000 g で 3 分間、室温で遠心した。その後、ホモジネート上清 350 µl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。
- 5) Solubilization バッファーを 175 µl 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行った。
- 6) 特級エタノール (>99%) を 175 µl 添加し再び最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンドウンしてマイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集した。
- 7) 抽出液完成後、調整した抽出液を全量、QuickGene-810 のカートリッジへ添加し、“RNA TISSUE PLUS” ボタンを選択して機械を作動させた。
- 8) 数分後に RNase-Free DNase set (QIAGEN, Tokyo, Japan) を添加して DNase 処理を行った後に機械を再始動させ RNA 抽出を再開し total RNA を回収した。
- 9) Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) を用いて、RNA 量を測定し、抽出した RNA は次ステップの使用まで -80°C で凍結保存した。

逆転写反応

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用した。

- 1) 抽出した RNA を RNase フリーの滅菌水で溶解し、100 ng/ μ l の溶液となるように調製した。
- 2) 下記の試薬を調整して、2 \times reverse transcription master mix を作成した。

コンポーネント	容量 /well (μ l)
10 \times RT Buffer	2.0
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8
10 \times RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Total per reaction	10.0

- 3) 2 \times reverse transcription master mix 10 μ l および RNA サンプル 10 μ l (1000 ng) を各ウェルに添加した。
- 4) 逆転写反応は、以下のサーマルサイクラーの設定で行った。
25 $^{\circ}$ C (10 分) \rightarrow 37 $^{\circ}$ C (120 分) \rightarrow 85 $^{\circ}$ C (5 分) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C (∞)
- 5) 合成した cDNA は使用時まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

Real-time PCR

目的の cDNA を増幅させるため、TaqmanTM アッセイによる定量的 PCR を行った。

- 1) qPCR マスターミックスを下記の試薬で調製した。

コンポーネント	容量 /well (μ l)
Taqman Universal Master Mix (2 \times)	12.5
Taqman Gene Expression Assay (20 \times)	1.25
Control Assays (GAPDH)	1.25
Nuclease-free H ₂ O	5.0
Total per reaction	20.0

- 2) 作製したマスターミックスを 20 μ l ずつ PCR ウェルに分注した.
- 3) 蒸留水を用いて希釈した各サンプルの cDNA 溶液を, 20 μ l ずつ PCR ウェルに添加し, 2 回ピペッティングを行い混合した.
- 4) 下記の反応条件でリアルタイム PCR を行った.

Step 1	50°C, 2 分
Step 2	95°C, 10 分
Step 3 (50 サイクル)	95°C, 15 秒 60°C, 1 分

内在性コントロールとして *Gapdh* を用い, 蛍光標識された PCR 産物の増幅曲線状の閾値線を基にサイクル数 (CT 値) を求め, Δ CT 法を用いて遺伝子発現を定量化した.

4.2.10. 低酸素モデル細胞培養 (DFO)

H9c2 細胞を培養するメディウムに鉄キレート剤 DFO 20 μ M を加えて細胞を培養した. 培養 24 時間後に細胞を回収し, その後の実験に使用した.

4.2.11. 炎症反応亢進マウスの作製

雄性 C57BL/6J マウスをコントロール群, LPS 群の 2 群に分け, コントロール群には PBS を, LPS 群には既報(Ando et al., 2000)を参考に LPS (15 mg/BW kg) を腹腔内投与した. 投与 6 時間後, 麻酔後 (2.5%トリブromoエタノール (以下 アバーチン) 8 μ l/BW g, 腹腔内投与) に十分な麻酔深度になったことを確認し, 心臓を採取した(Kinugawa et al., 2000).

4.2.12. ミトコンドリア呼吸能

ミトコンドリア当たりの呼吸能

2.1.2.4.と同様の方法でミトコンドリアの呼吸能を測定した. 測定には単離したミトコンドリアを使用し, プロトコルに従って基質を順に加えて各ステートごとの呼吸能を評価した.

細胞当たりの呼吸能

回収した培養細胞を oxygraph-2k のチャンバーに入れ (1.0 x 10⁵ ~ 10⁶ 個), ジギトニン 25 mg/l を加えて細胞膜透過処理をした. その後, プロトコルに従って基質を順に加えて各ステートごとの呼吸能を評価した.

プロトコル

- 1) Complex Iに関連する基質である, グルタミン酸 glutamate 10 mmol/l とリンゴ酸 malate 2 mmol/l とピルビン酸 pyruvate 5 mmol/l を加えた.
- 2) 塩化マグネシウム $MgCl_2$ 3 mmol/l と ADP 10 mmol/l を加えた. (CI_OXPHOS)
- 3) Complex IIに関連する基質である, コハク酸 succinate 10 mmol/l を加えた (CI+II_OXPHOS).
- 4) Complex II 単独の OXPHOS の呼吸を観察するため, complex I の阻害剤である ロテノン rotenone 0.5 μ mol/l を加えた (CII_OXPHOS).
- 5) ADP 非依存的な leak state の呼吸を観察するため, ATPase の阻害薬であるオリゴマイシン oligomycin 2.5 μ mol/l を加えた (CII_LEAK).
- 6) 最大の呼吸機能を見るため, 脱共役剤である carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 1 μ mol/l を加えた (CII_ETS).
- 7) Complex III の阻害薬である, アンチマイシン antimycin a 2.5 μ mol/l を加え, ミトコンドリアに関する呼吸を停止させた (ROX).
- 8) Complex IV の基質であるアスコルビン酸 ascorbate 2 mmol/l と N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine (TMPD) 0.5 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定した. 次に, 阻害剤であるアジ化ナトリウム sodium azide 100 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定し, その差分を計算した (CIV_OXPHOS).

4.2.13. 統計学的解析

統計処理は, GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った. データは, 平均値 \pm 標準誤差で示した. 2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの *t* 検定で行った. 多群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, 有意差がみられた場合に Tukey 法または Dunnett 法による多重比較検定を行った. *P*-values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した.

4.3. 結果

4.3.1. SDHA 発現量低下が complex II の発現量や機能に及ぼす影響.

Complex II サブユニットの発現量低下が complex II の発現量や機能に及ぼす影響を評価するため、培養細胞で SDHA 遺伝子をノックダウンし、その際の complex II の発現量や機能を評価した. siSDHA を用いて C2C12 細胞の SDHA をノックダウンした. 細胞当たりの SDHA の発現量は低下していたが、他の complex II サブユニット (SDHB, SDHC, SDHD) の発現量は変化しなかった. また、SDHA の発現量はミトコンドリア内においても有意に低下した (図 4-4).

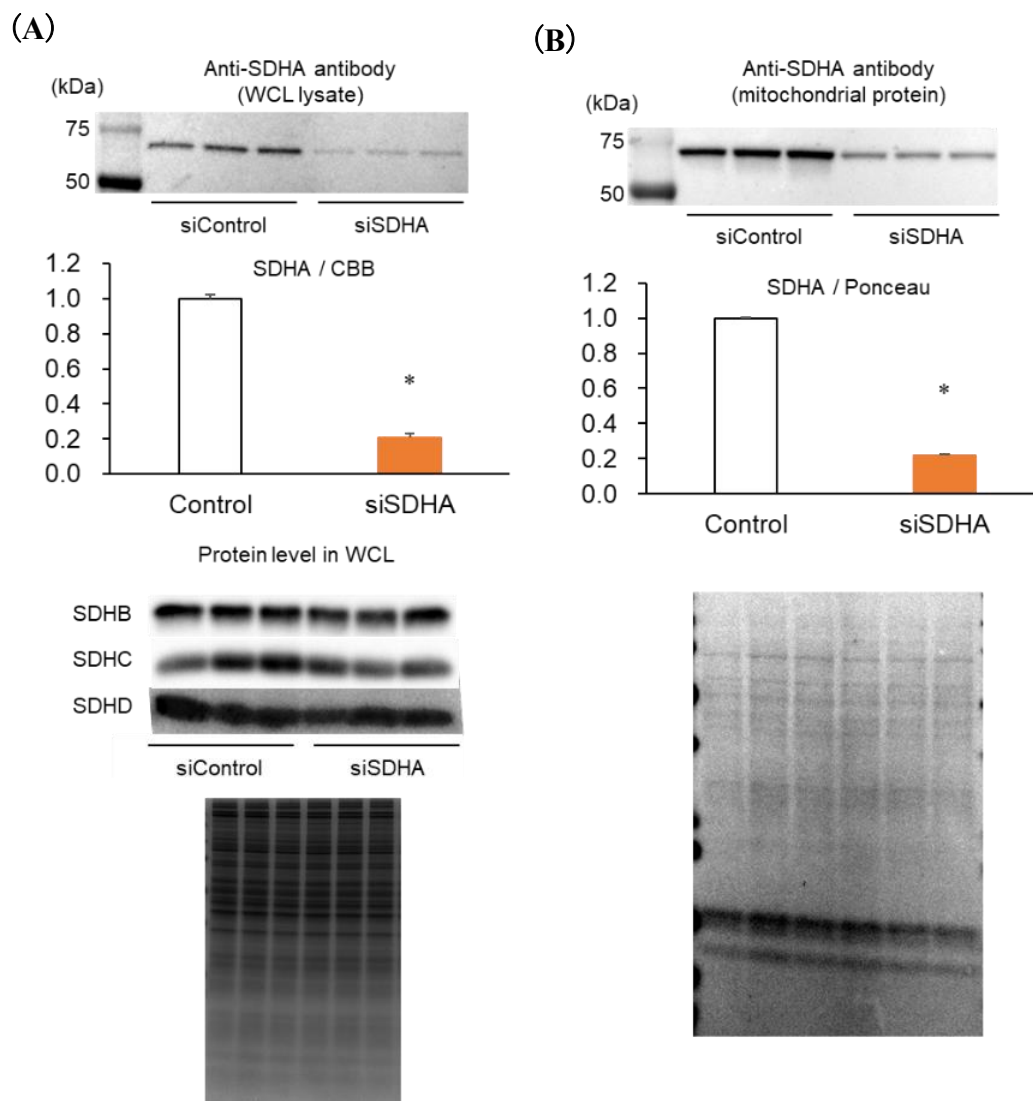


図 4-4. コントロール群と siSDHA 群における SDH サブユニット発現量の比較.

(A) WCL における SDH サブユニットの発現量の比較. (B) ミトコンドリアタンパク質あたりの SDHA の発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3). * $p < 0.05$ vs. control 群.

SDHA をノックダウンした細胞では complex II の発現量が低下し、complex II の呼吸能が低下した (図 4-5).

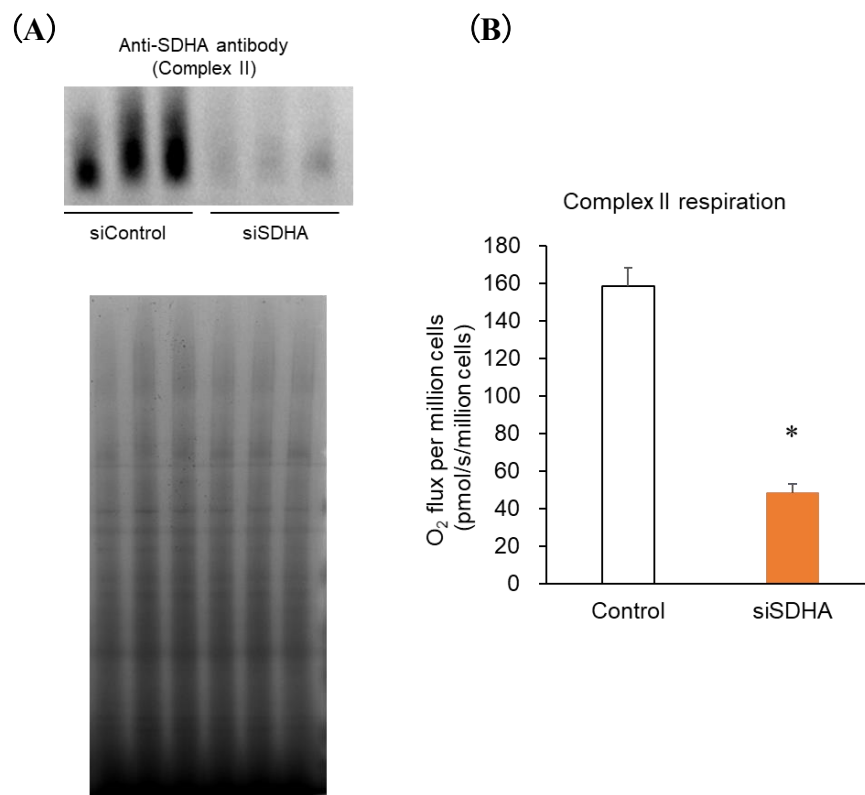


図 4-5. コントロール群と siSDHA 群におけるミトコンドリア当たりの complex II の発現量 (A) と呼吸能の比較 (B).

データは平均値±標準誤差 (n=3). * $p < 0.05$ vs. control 群.

4.3.2. コントロール群と心不全群における細胞当たりの complex II サブユニット、会合因子の発現量の比較.

心筋梗塞後早期にミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量が低下した原因を探るため、細胞当たりの発現量を評価した。Complex II の呼吸能、発現量ともに心不全群で有意に低下した心筋梗塞 6 時間後に焦点をあて、ミトコンドリア当たりの発現量が 6 時間後に有意に低下した SDHA, SDHD, SDHAF1 の細胞当たりの発現量を評価した。SDHA, SDHD は細胞当たりの発現量は心不全群で有意に高く、SDHAF1 の細胞当たりの発現量は有意に低下した (図 4-6)。

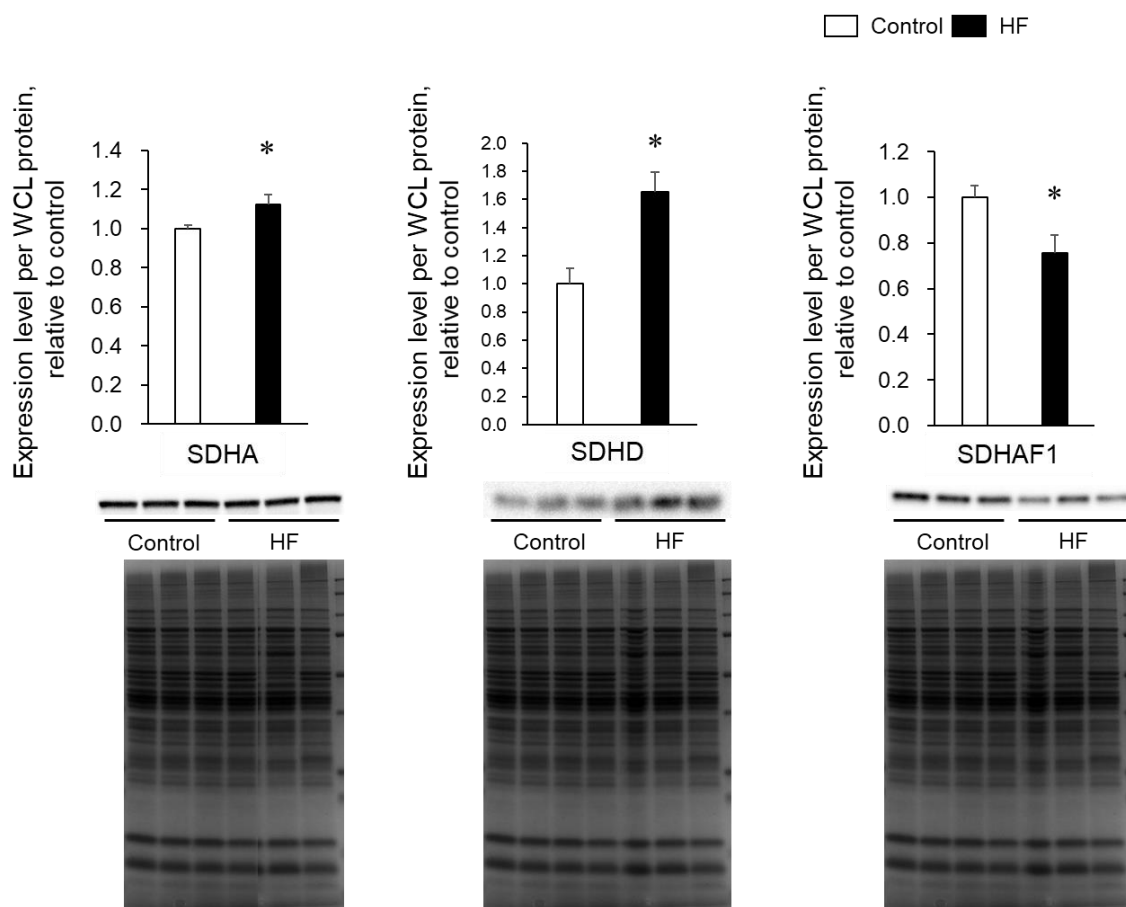


図 4-6. コントロール群と心不全群における細胞当たりの SDHA, SDHD, SDHAF1 の発現量の比較.

データは平均値 \pm 標準誤差 (n=6). * $p < 0.05$ vs. control 群.

4.3.3. コントロール群と心不全群における心筋梗塞後早期の SDHAF1 の mRNA レベルの比較.

SDHAF1 の発現量は細胞当たりでも有意に低下していたため、mRNA レベルをコントロール群と心不全群で比較した. コントロール群と心不全群で差は無かった (図 4-7).

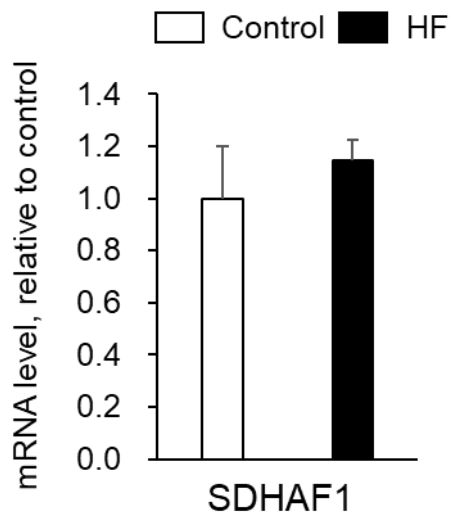


図 4-7. コントロール群と心不全群における SDHAF1 の mRNA レベルの比較. データは平均値±標準誤差 (n=3).

4.3.4. コントロール群と心不全群における心筋梗塞後早期の炎症反応評価

心筋梗塞後早期の complex II サブユニットや会合因子のミトコンドリア内発現量の低下のトリガーとして、心筋梗塞による心筋低酸素や炎症反応亢進を考えた。まず、心筋梗塞後の炎症反応亢進を確認するため、心筋におけるサイトカインの発現を mRNA レベルで評価した。TNF- α 、IL6 の発現量は心不全群で有意に増加し、IL1 β は増加傾向を示した (図 4-8)。

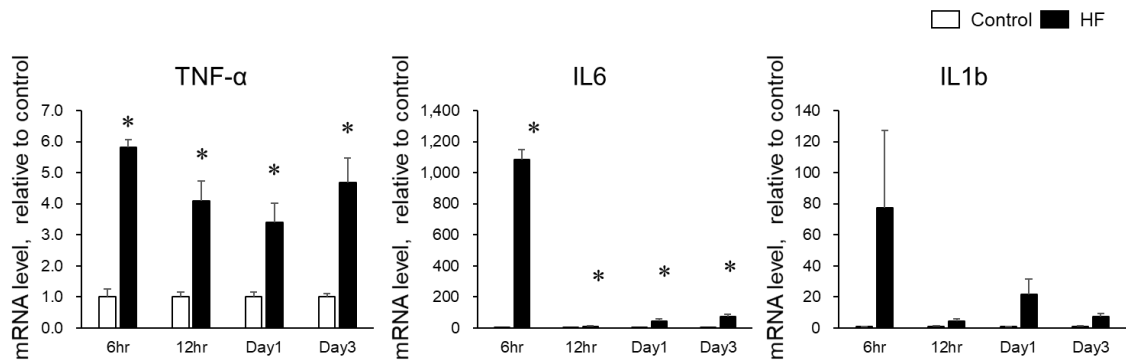


図 4-8. コントロール群と心不全群における TNF- α 、IL6、IL1 β の mRNA レベルの比較.

データは平均値 \pm 標準誤差 (n=3-5). * $p < 0.05$ vs. Control 群.

4.3.5. 炎症反応の亢進が complex II 機能に及ぼす影響

炎症反応の亢進が complex II に及ぼす影響を調べるため、コントロール群には PBS を、炎症反応亢進群には LPS を C57BL/6J マウスに腹腔内投与して比較した (Ando et al., 2000). 投与 6 時間後に心筋でのサイトカインの発現量を mRNA レベルで評価したところ、IL-1 β , TNF- α の発現量は LPS 群で有意に増加した. Complex II の呼吸能は両群間に差はなかった (図 4-9).

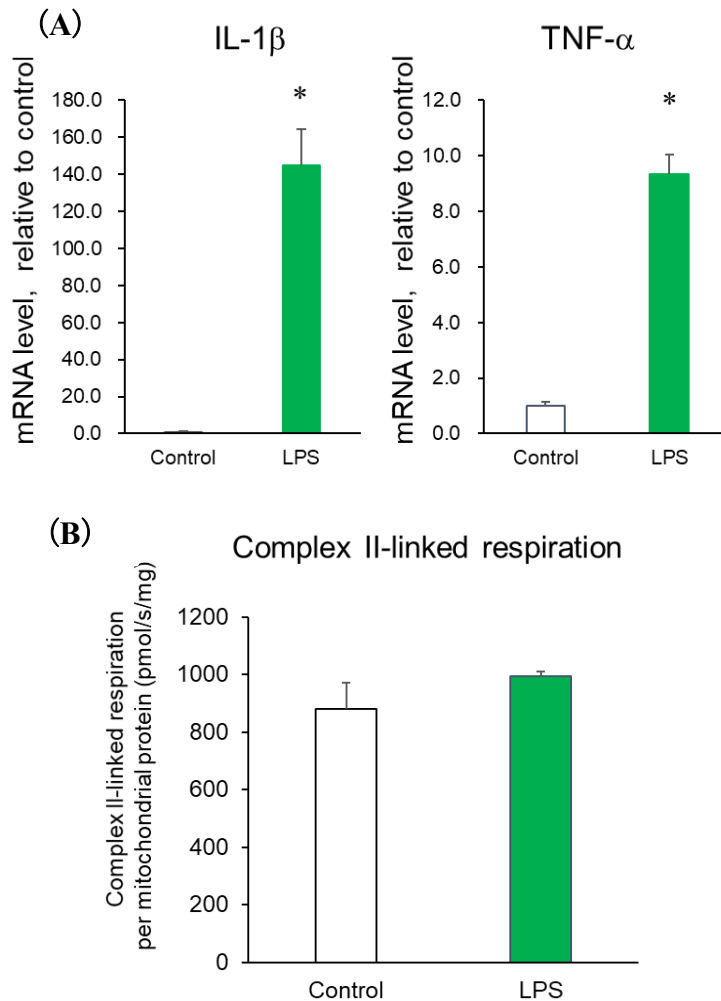


図 4-9. コントロール群と LPS 群における IL1 β , TNF- α の mRNA レベルの比較 (A). コントロール群と LPS 群マウス心筋ミトコンドリアの complex II 呼吸能の比較 (B).

データは平均値 \pm 標準誤差 (n=3). * p <0.05 vs. control 群.

4.3.6. コントロール群と心不全群における心筋梗塞後早期の低酸素評価

次に、心筋梗塞後の非梗塞部位の心筋が低酸素に陥っているかどうかを評価するため、CA9, Glut1 の mRNA レベルの評価をしたところ(Busk et al., 2011), CA9, Glut1 いずれも心不全群で有意に増加した (図 4-10)。

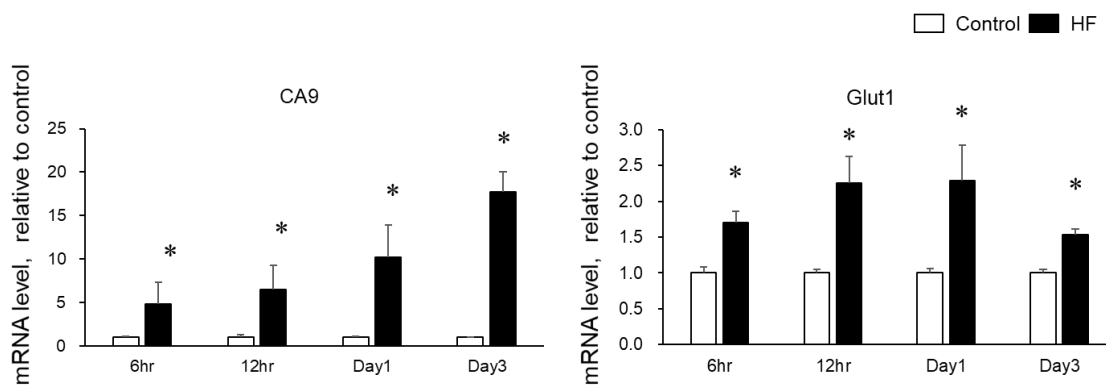


図 4-10. コントロール群と心不全群における CA9, Glut1 の mRNA レベルの比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3-5). * $p < 0.05$ vs. control 群.

4.3.7. 低酸素が complex II の発現量，機能に及ぼす影響

既報(Zeng et al., 2011)を参考に，低酸素モデルとして Deferoxamine (DFO：鉄キレート剤) を含んだ培養液で H9c2 細胞を 24 時間培養し低酸素群とした．DFO を含まずに培養した細胞をコントロール群として complex II の機能や発現量を比較した．まず，Real time-PCR 法により Glut1 や CA9 の mRNA レベルを比較したところ，心不全群で有意に増加した (図 4-11)．

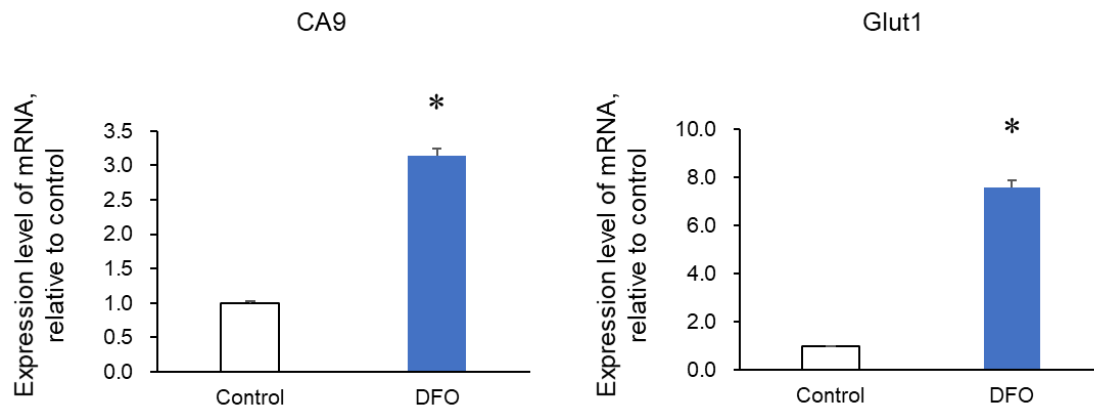


図 4-11. コントロール群と DFO 群における CA9, Glut1 の mRNA レベルの比較. データは平均値±標準誤差 (n=4). * $p < 0.05$ vs. control 群.

コントロール群, 低酸素群で complex II の呼吸能を測定したところ, 低酸素群で有意に低下した (図 4-12).

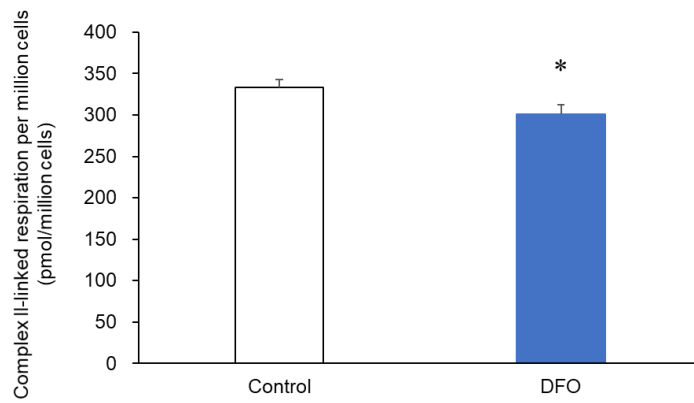


図 4-12. コントロール群と低酸素群における complex II 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=8). * $p < 0.05$ vs. control 群.

次に、ミトコンドリア当たりの **complex II** の発現量をブルーネイティブ法で比較したところ、低酸素群で有意に低下した (図 4-13)。

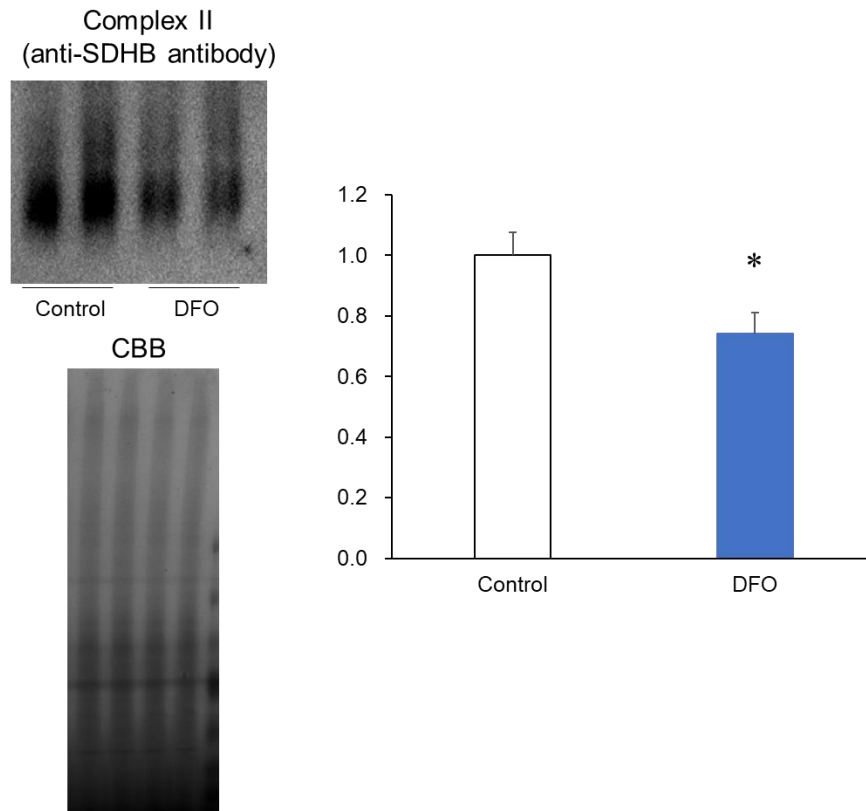


図 4-13. コントロール群と低酸素群における **complex II** 発現量の比較.
データは平均値±標準誤差 (n=6). * $p < 0.05$ vs. control 群.

Complex II サブユニットのミトコンドリア当たりの発現量をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で比較したところ、SDHA の発現量は低酸素群で有意に低下した (図 4-14)。

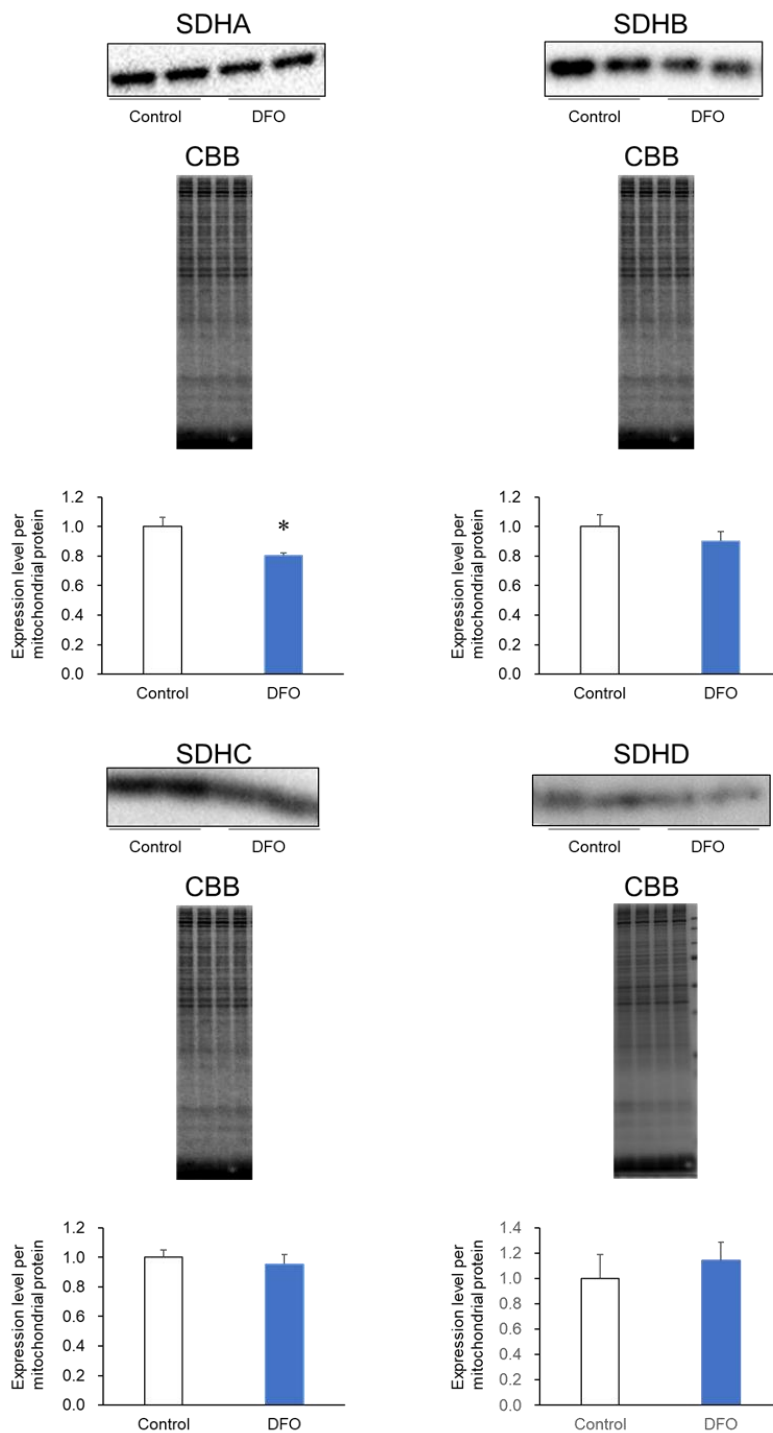


図 4-14. コントロール群と低酸素群におけるミトコンドリア当たりの complex II サブユニットの発現量の比較。

データは平均値±標準誤差 (n=6-8). * $p < 0.05$ vs. control 群.

ミトコンドリア当たりの SDHA の発現量が低酸素群で有意に低下したため、SDHA の whole cell lysate の発現量をコントロール群と低酸素群で比較した。Whole cell lysate の SDHA の発現量は両群間で有意差はなかった (図 4-15)。

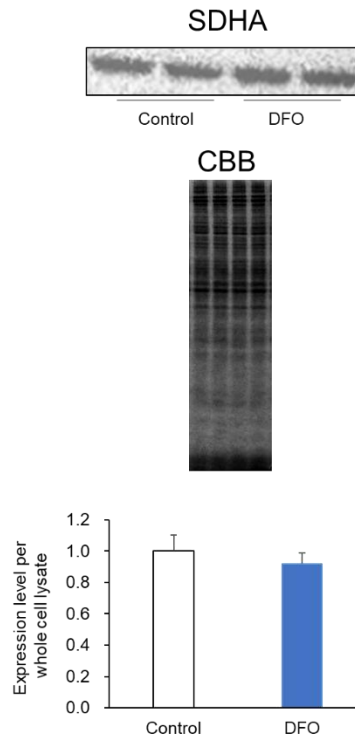


図 4-15. コントロール群と低酸素群における whole cell lysate の SDHA の発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=5).

4.4. 考察

心筋梗塞後早期には complex II のサブユニットや会合因子のミトコンドリア当たりの発現量が心不全群で低下しており、これが complex II の発現量低下、機能低下の原因であると考えられた。siRNA で SDHA をノックダウンした際に complex II の発現量が低下し、呼吸能も低下した (図 4-5) ことから、complex II サブユニットの発現量が低下することで complex II を構成できずに発現量が低下し、それに伴って機能も低下することが示された。

次に、complex II のサブユニットや会合因子が低下するメカニズムを探るため、心筋梗塞 6 時間後に有意な低下を示した SDHA, SDHD, SDHAF1 について細胞当たりでの発現量を評価したところ、SDHA, SDHD は細胞当たりでの発現量は心不全群で低下しておらず、むしろ増加していた (図 4-6)。このことから、SDHA や SDHD は細胞質には存在しているものの、ミトコンドリアへの輸送が阻害されているためにミトコンドリア当たりの発現量が低下していると考えられた。ミトコンドリアへの輸送が低下するメカニズムについては本研究では明らかにできなかったが、タンパク質をマトリックス内に輸送する働きをもつ TOM, TIM 複合体の発現量や機能が低下している可能性が考えられ、今後の検討課題である。一方、SDHAF1 は細胞当たりでも有意に低下していたことから、転写レベルで低下しているか、つくられたタンパク質の分解が亢進していると考えられた。Real time-PCR により mRNA レベルを評価したところ、両群間で差はなかった (図 4-7) ことから、転写レベルの低下ではなくタンパク質の分解亢進が原因であると推測された。分解系についての評価は本研究では行っておらず今後の課題である。

心筋梗塞後早期に complex II のサブユニットの発現量が低下するトリガーとして、上述したように炎症反応亢進や低酸素が complex II サブユニット発現量低下の誘因となるかを検証した。

心筋梗塞後の心筋では非梗塞領域も含めて炎症反応が亢進していることが報告されている (Irwin et al., 1999) が、Real time-PCR によるサイトカインの評価で本研究の心筋梗塞マウスでも炎症反応が亢進していることが示された (図 4-8)。炎症反応の亢進が complex II 機能低下の原因となるかどうか評価するために、マウスに LPS を投与して炎症反応を亢進させた (Ando et al., 2000)。LPS 投与後の心筋を採取し、PCR で炎症反応が亢進していることを確認した (図 4-9)。このマウスの心筋ミトコンドリアにおける complex II の機能を評価したところ、LPS 投与群で機能低下はなく、炎症反応の亢進は complex II 機能低下の主原因ではないと考えられた (図 4-9)。

次に、心筋組織が低酸素に陥っていると考え、低酸素マーカーとして知られる CA9 や Glut1 の発現量を評価した。特に mRNA レベルが細胞の低酸素のよい指標となることが報告されている(Busk et al., 2011)ため、mRNA レベルで評価したところ、いずれも心筋梗塞後早期で有意に増加しており、心筋の低酸素が示唆された(図 4-10)。そこで、低酸素モデルの培養細胞を用いて complex II の機能を評価した。低酸素モデルとして、これまでに広く使用されている鉄キレート剤である DFO を加えて培養した H9c2 細胞を使用した(Zeng et al., 2011)。DFO を加えて培養した群では CA9 や Glut1 の mRNA レベルが増加していることを確認した(図 4-11)。低酸素群はコントロール群と比較し、complex II の呼吸能が低下した(図 4-12)。ミトコンドリア当たりの complex II サブユニット (SDHA) の発現量の低下(図 4-14)が complex II の発現量低下(図 4-13)を引き起こし、これが呼吸能低下の原因と考えられた。心筋梗塞後早期のミトコンドリア当たりの complex II サブユニット発現量は、図 3-13 に示したように 4 つのサブユニット (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) 間で必ずしも一致した動きはしない。全体的に低下傾向はあるものの、例えば SDHA は 6 時間後、SDHC は 1 日後に有意に低下したというように、低下するタイミングはサブユニットごとに異なっていた。今回コントロール群と低酸素群の比較ではミトコンドリア当たりの発現量は低酸素群で SDHA のみ有意に低下したが、DFO の濃度や培養時間を変化させることで各サブユニットの発現量は変動することが推測される。ミトコンドリア当たりでは SDHA の発現量は低酸素群で有意に低下したが、whole cell lysate では低下しておらず(図 4-15)、これは心筋梗塞後早期のサブユニットの挙動と一致していた。

心筋梗塞後早期の心筋で低酸素マーカーが上昇したこと、低酸素群でミトコンドリア当たりの complex II サブユニット発現量が低下したこと (whole cell lysate でのサブユニットの低下はなし)、complex II 発現量が低下したこと、complex II の呼吸能が低下したことから、低酸素が心筋梗塞早期にみられた complex II の機能低下の一因であることが示唆された。

ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットの発現量低下は心筋梗塞後早期にみられるものの、治療介入なしに 14 日後にはコントロールと同程度の発現量であった(図 3-12)。また、complex II 呼吸能も 3 日後、7 日後とコントロールと同程度であったことから(図 3-8)、心筋梗塞後早期の complex II 機能低下に対する治療介入の必要性はないのかもしれない。しかし、早期のミトコンドリア機能低下が慢性期のミトコンドリア機能に影響を及ぼしている可能性もあり、その場合には早期のミトコンドリア機能低下に介入する意義がある。これらの点については今後の検討が必要である。

第5章：心筋梗塞後心不全マウス慢性期の心筋ミトコンドリア complex II 機能低下の原因に関する研究

5.1. 実験5：コントロール群，心不全群における succinyl-CoA 及びミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の比較と complex II 呼吸能との関連.

5.1.1. 緒言

実験3（第3章）により心筋梗塞後心不全マウスの早期，慢性期の心筋ミトコンドリア complex II 機能が低下することが明らかとなった。また，実験4（第4章）では早期の complex II 機能低下は complex II サブユニットや会合因子のミトコンドリア内の発現量低下が一因であることを示した。慢性期には心不全群のサブユニットや会合因子のタンパク質発現量はコントロール群と同等まで改善しており（実験3），complex II 機能低下の要因は早期とは異なると推測された。心筋梗塞後慢性期は心不全を発症している（実験3）ことから，心不全に関連した下記の要因が考えられた。

心不全の心筋では，ケトン代謝やヘム合成が亢進することが報告されている (Bedi et al., 2016; Khechaduri et al., 2013)。不全心筋では心筋の主要なエネルギー源である脂肪酸の利用能力が低下し，その代替としてケトン体の利用と代謝が亢進する (Aubert et al., 2016)。また，心不全の心筋におけるミトコンドリア機能は低下するが，ミトコンドリア内で初期過程が始まるヘム合成は亢進する (Khechaduri et al., 2013)。このヘム合成亢進は adaptive な反応か maladaptive な反応なのか結論は出ていない (Khechaduri et al., 2013)。

これら2つの経路に共通した重要な酵素としてサクシニル CoA がある。図 5-1 に示すように TCA サイクルにおいて，サクシニル CoA は complex II への succinate の供給源となっており，サクシニル CoA が complex II の機能に関与する可能性がある。

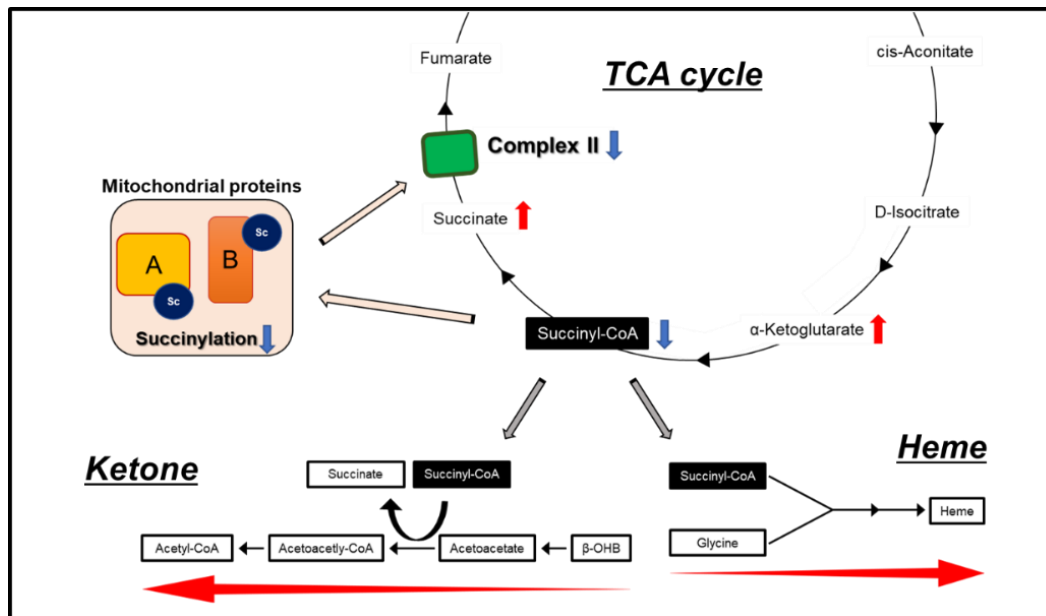


図 5-1. TCA サイクル，ケトン代謝，ヘム合成経路におけるサクシニル CoA

サクシニル CoA は心筋組織内の Acyl-CoA の中で最も豊富に存在するもので、ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化に寄与する(Sadhukhan et al., 2016). サクシニル化はタンパク質翻訳後修飾の 1 つで、サクシニル化が complex II の機能に影響を及ぼす可能性が知られている(Zhang et al., 2017). これまでに心不全においてサクシニル CoA が減少することは報告されている(Bedi et al., 2016)が、心不全におけるサクシニル CoA の減少がミトコンドリアタンパク質のサクシニル化や complex II の機能に与える影響は明らかになっていない. そこで我々は、「心不全ではサクシニル CoA が減少し、ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が減少し、complex II の機能が低下する」という仮説を立て、これを実験 5 で検証した.

5.1.2. 方法

5.1.2.1. 心不全モデルマウスの作製

3.2.1.と同様の方法で心不全モデルマウスを作製した。慢性期の評価のため28日後に心臓を摘出した。

5.1.2.2. 質量分析

心筋からの代謝物質抽出

液体窒素で凍結した心筋組織 (70-90 mg) を金属小片で MultiBeads Shocker を用いて 2,000 rpm 10 秒間で破砕した。破砕したサンプルを 70%メタノール, 10 mg/ml 2- (N-Morpholino) -ethanesulfonic acid (MES) に BIORUPTOR を用いて溶解した (30 秒間超音波処理した後 30 秒間冷却を 5 セット繰り返した)。21,500 g で 5 分間遠心し, 上清を回収し, 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 用のサンプルとした。

液体クロマトグラフィー質量分析による代謝産物の解析

サクシニル CoA を含む TCA サイクルの中間代謝物を測定するために, 上清の 5 μ l を ACQUITY BEH カラムにアプライして分離し, LCMS 8040 を使用して分析した。移動相は (A) 15 mM 酢酸, 10 mM トリブチルアミン, 3%メタノール, (B) 100%メタノールとした。グラジエント溶離は, 次のようにメタノール濃度を徐々に上げた: 0~6 分, 0% B; 6~26 分, 0-90% B; 0% B まで低下させて 15 分。流速は 0.3 mL/min, カラムオープン温度は 40°C, エレクトロスプレーイオン化に関するパラメータは下記の通りとした。ドライイングガス流速 15 L/min; ネブライザーガス流速 3 L/min; ヒーティングガス 10 L/min; 脱溶媒管 (Desolvation line) 温度 250°C; ヒートブロック温度 400°C, 衝突ガス 230 kPa。データ解析は Labsolutions software (島津, 日本) を使用し, シグナル強度は MES シグナルを標準とした。

5.1.2.3. 組織からのミトコンドリア単離

2.1.2.2.と同様の方法でミトコンドリアを単離した。

5.1.2.4. 細胞からのミトコンドリア単離

4.2.5.と同様の方法でミトコンドリアを単離した。

5.1.2.5. ミトコンドリアタンパク質濃度測定

2.1.2.2.と同様の方法でタンパク質濃度を測定した.

5.1.2.6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.1.2.5.と同様の方法で行った.

5.1.2.7. ブルーネイティブ電気泳動法

2.1.2.6.と同様の方法で行った.

5.1.2.8. ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化/脱サクシニル化アッセイ

単離ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化

組織, 細胞から単離したミトコンドリアにサクシニル CoA (0, 0.3, 1, 3, 10 mM) を加え, 30°Cで 15 分静置した.

単離ミトコンドリアタンパク質の脱サクシニル化

- 1 リジン : C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアに 1.0, 10 mM のリジンを加え, 15 分間インキュベートした. リジンを加えることによる pH 変化の影響を考慮して, HCl を加えて pH を調製した.
- 2 SIRT5 (Recombinant human SIRT5) : C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアに, recombinant SIRT5 20 μ g と NAD 5 mM を加え, succinyl-CoA 0, 3, 10 mM とともに 37°Cで 60 分間静置した. SIRT5 の量は既報を元に決定した (Nakagawa et al., 2009).
- 3 Acetyl-CoA : 過去の報告(Quant et al., 1990)を参考に, C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアを desuccinylation medium で溶解し, Acetyl-CoA 0.1 mM もしくは 1 mM 加え, 30°Cで 1 時間静置した.

培養細胞のミトコンドリアタンパク質脱サクシニル化

- 1 グリシン : H9c2 細胞の培養液にグリシン 100 mM を加え, 6 時間培養した. 培養後に細胞を回収し, ミトコンドリアを単離した.
- 2 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) : 過去の報告(Chen et al., 2017)を参考に, H9c2 細胞の培養液に 15 mM の 2-DG を加え, 20 分間培養した. 培養後に細胞を回収し, ミトコンドリアを単離した.
- 3 Iodoacetic acid (IAA) : 過去の報告(Chen et al., 2017)を参考に, H9c2 細胞の培養液に 5 μ M の IAA を加え, 20 分間培養した. 培養後に細胞を回収し, ミトコンドリアを単離した.

- 4 Tyrphostin A9 (TA9) : 過去の報告(Chen et al., 2017)を参考に, H9c2 細胞の培養液に 5 μM の TA9 を加え, 20 分間培養した. 培養後に細胞を回収し, ミトコンドリアを単離した.

5.1.2.9. β -OHB 測定

beta HB Assay kit (ab83390, Abcam) を使用して, 心筋の β -OHB 量を測定した.
サンプルの準備

- 1) マウスから心筋を採取し, 心筋 15-20 mg と beta HB Assay Buffer 200 μl をガラス製のホモジナイザーに入れ, 15 回ホモジナイズした.
- 2) エッペンチューブに移し, 20,000 g で 5 分間遠心し, 上清を新たなエッペンチューブに移した.
- 3) サンプル 100 μl に対して Perchloric acid (PCA) 6 M を 20 μl 加え, 氷上で 5 分間インキュベートした.
- 4) 13,000 g で 2 分間遠心し, 上清を新たなエッペンチューブに移した.
- 5) pH 6.5-8.0 になるように 2 M KOH を加えた.
- 6) 13,000 g で 15 分間遠心し, 上清を新たなエッペンチューブに移した.

スタンダードの準備

- 1) beta HB のスタンダードを水で 10 倍希釈し, 96 ウェルプレートに 0, 4, 8, 12, 16, 20 μl を入れ, トータル 50 μl になるように beta HB Assay Buffer を加えた.
- 2) beta HB Assay Buffer 46 μl , Enzyme Mix 2 μl , Substrate Mix 2 μl を混合して Reaction Mix を作製し, 各ウェルに 50 μl ずつ加えた.

サンプルの測定

- 1) 96 ウェルにサンプル 50 μl を加え, 上記の Reaction Mix を 50 μl ずつ加えた.
- 2) 遮光して 30 分間室温でインキュベートした.
- 3) マイクロプレートリーダーで 450 nm 波長の吸光度を計測した.

スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルの β -OHB 量を算出した.

5.1.2.10. ミトコンドリアヘムの測定

QuantiChrom™ Heme Assay Kit を使用してミトコンドリアヘムを測定した.

- 1) 上述した方法でマウスから採取した心筋からミトコンドリアを単離した. タンパク質濃度を測定し, 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ に調製した.
- 2) 96 ウェルプレートにサンプル 50 μl と Reagent 200 μl を加えた.
- 3) コントロールとして, Kit の Calibrator 50 μl と Reagent 200 μl を加えた.

- 4) マイクロプレートリーダーで 400 nm 波長の吸光度を計測した。
コントロールを 62.5 μ M とし、サンプルのミトコンドリア濃度を算出した

5.1.2.11. ミトコンドリア呼吸能

2.1.2.4.と同様の方法でミトコンドリア呼吸能を測定した。

5.1.2.12. 免疫沈降

- 1) マウスを屠殺し、心筋からミトコンドリアを単離した。
- 2) ミトコンドリアタンパク質の濃度を測定した。
- 3) ミトコンドリアタンパク質 1 mg を 0.5% lauryl maltoside を含む PBS で溶解した。
- 4) 氷上で 30 分間静置した。
- 5) 20,000 g で 30 分間遠心し、上清を新たなエッペンチューブに移した。
- 3) サンプルに免疫沈降用の抗体 1 μ g/ml を加え、4°C で翌朝までインキュベートした。
- 4) アガロース結合抗体 (rProtein A SepharoseTM Fast Flow : GE Healthcare) を加え、4°C, 6 時間インキュベートした。
※ビーズとクロスリンクした抗体を使用した場合には抗体を加えて翌朝までインキュベートし、(5) の工程は省略した。
- 5) 5,000 rpm でスピンドウンし、上清を破棄した。
- 6) Wash buffer*2 で 5 回洗浄した。
*2 Wash buffer の組成: NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 7.6 50 mM, Triton 0.1%4.5 ml
- 7) 5,000 rpm でスピンドウン後、上清を破棄した。
- 8) 20 μ l のグリシン (1 M, pH 2.8) でサンプルを溶解し、氷上で 15 分間インキュベートした。1 分おきにピペッティングした。
- 9) 1500 g で 1 分間遠心し、上清を新たなエッペンチューブに移した。
- 10) 9) をもう一度繰り返した。
- 11) 5 μ l の 2x sample buffer を加えた。サンプルは黄色に変化した。
- 12) Tris-HCl (1 M, pH 7.4) を少量ずつサンプルが青くなるまで加えた。
- 13) 加えた Tris-HCl 量から計算し、必要な 2x sample buffer を加えた。
- 14) 100°C で 5 分間煮沸した。
- 15) -80°C で保存した。

5.1.2.13. 統計学的解析

統計処理は、GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った。データは、平均値±標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った。多群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い、有意差がみられた場合に Tukey 法または Dunnett 法による多重比較検定を行った。 P -values<0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

5.1.3. 結果

5.1.3.1. コントロール群, 心不全群における心筋の succinate, α ケトグルタル酸, サクシニル CoA 量の比較.

心筋当たりの succinate, α ケトグルタル酸は心不全群で増加したのに対してサクシニル CoA は心不全群で有意に低下した (図 5-2).

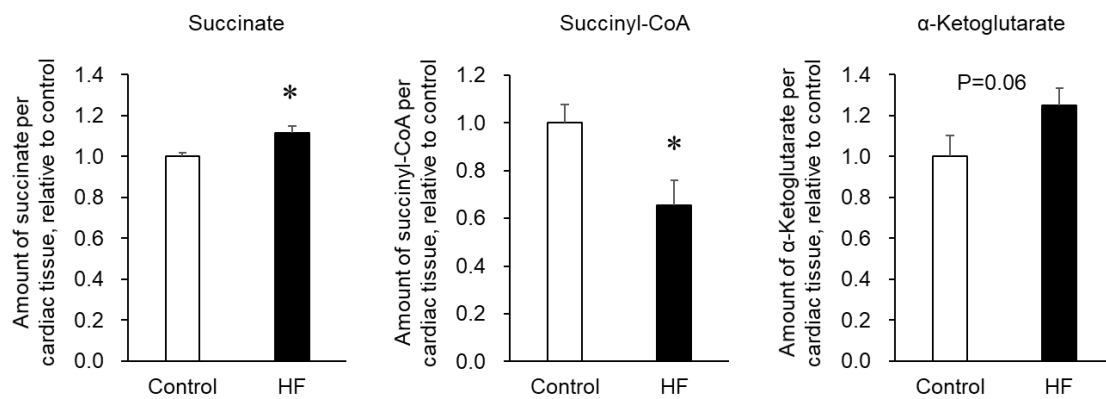


図 5-2. コントロール群, 心不全群の心筋組織当たりの succinate, サクシニル CoA, α ケトグルタル酸量の比較.

データは平均値 \pm 標準誤差 (n=6). * p <0.05 vs. control 群.

5.1.3.2. コントロール群, 心不全群におけるサクシニル CoA 合成酵素発現量の比較.

TCA サイクルでサクシニル CoA を succinate と CoA に変換する酵素であるサクシニル CoA 合成酵素 (SUCLA2, SUCLG1) の増加はサクシニル CoA を減少させる要因になる. これらのサクシニル CoA 合成酵素の発現量をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価すると, SUCLA2 は心不全群で有意に低下, SUCLG1 は心不全群で低下傾向を示した. この結果から, この酵素がサクシニル CoA の減少に関与していることは否定的と考えられた (図 5-3). TCA サイクルのみでサクシニル CoA の減少を説明することは困難である. サクシニル CoA は TCA サイクル以外の経路, すなわち, ケトン代謝やヘム合成にも関与しており, これらの経路について評価する必要があると考えた.

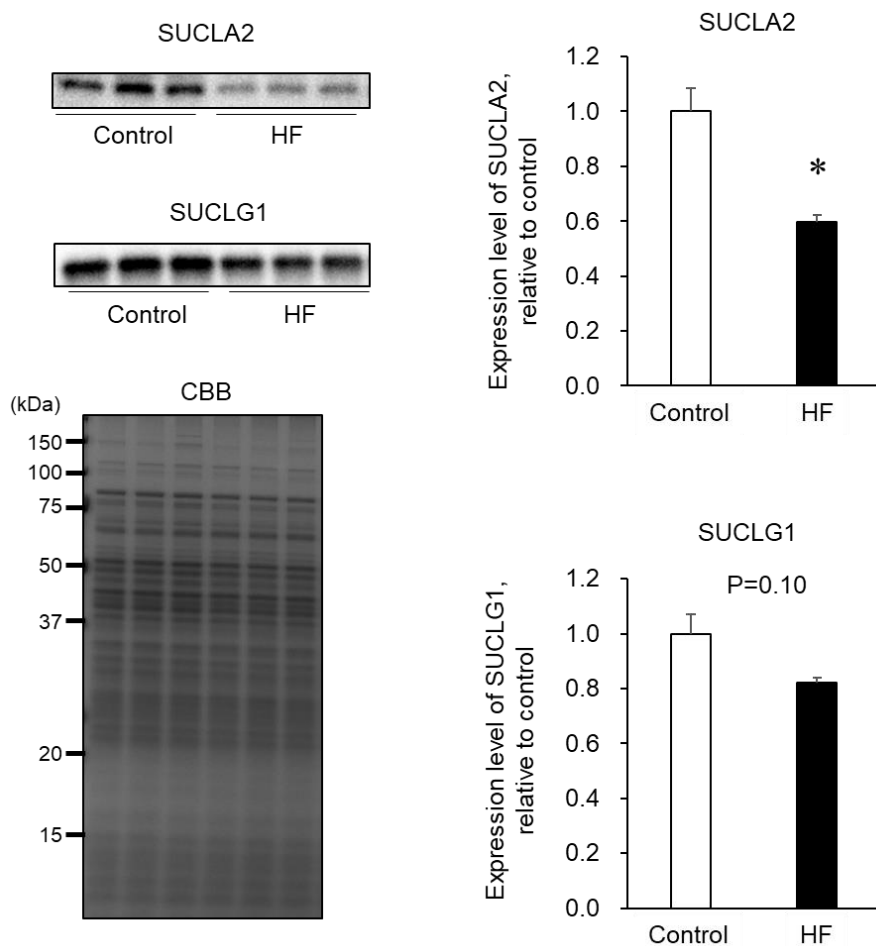


図 5-3. コントロール群, 心不全群のミトコンドリア当たりのサクシニル CoA 合成酵素発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=6). * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.1.3.3. コントロール群, 心不全群におけるケトン代謝の比較

ケトン代謝では, OXCT-1 がアセトアセテートからアセトアセチル CoA を産生する際に, CoA の供給源としてサクシニル CoA を succinate に変換する (図 5-1). この OXCT-1 のミトコンドリア当たりの発現量は心不全群で有意に増加していた. また, ケトン体 (β -OHB) 量は心筋組織で減少し, 血中で増加した. これは既報と同様であり (Bedi et al., 2016), 心不全群でのケトン代謝が亢進していた (図 5-4).

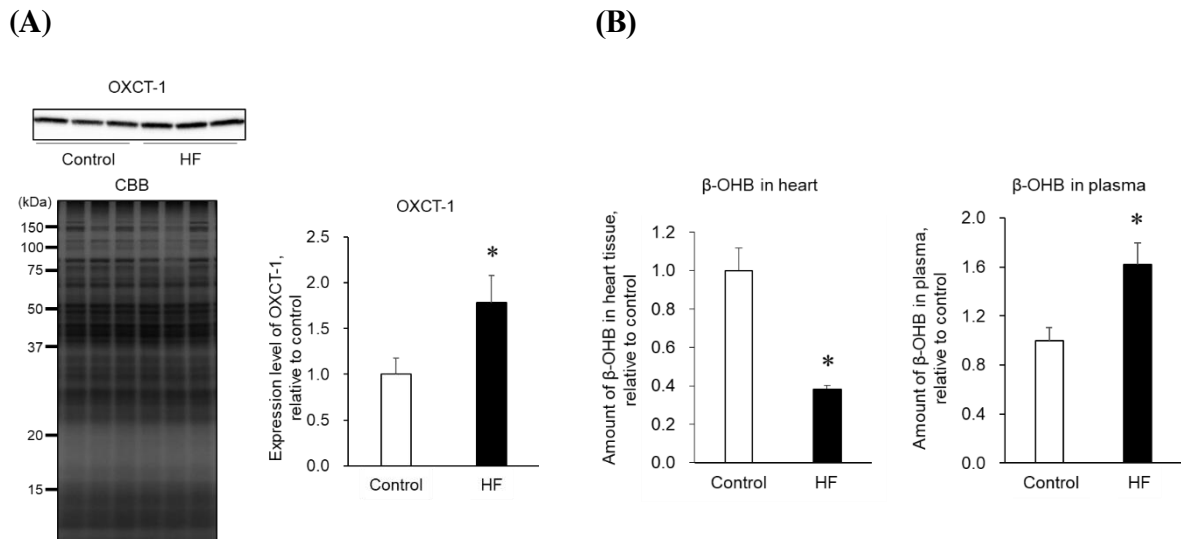


図 5-4. コントロール群, 心不全群のミトコンドリア当たりの OXCT-1 発現量の比較 (A). 心筋, 血液中の β -OHB 量の比較 (B).

データは平均値 \pm 標準誤差 (n=4-12). * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.1.3.4. コントロール群, 心不全群におけるヘム合成の比較

サクシニル CoA はヘム合成にも関与し, ヘム合成の初期段階の反応はミトコンドリア内で起こり, ALAS によってグリシンとサクシニル CoA から ALA が合成される (図 5-1). この ALAS の発現量やミトコンドリアのヘムは心不全群で有意に増加した (図 5-5). これらのことから, サクシニル CoA はケトン代謝やヘム合成の亢進により消費され, その結果, 心不全群でサクシニル CoA が減少していると考えられた.

(A)

(B)

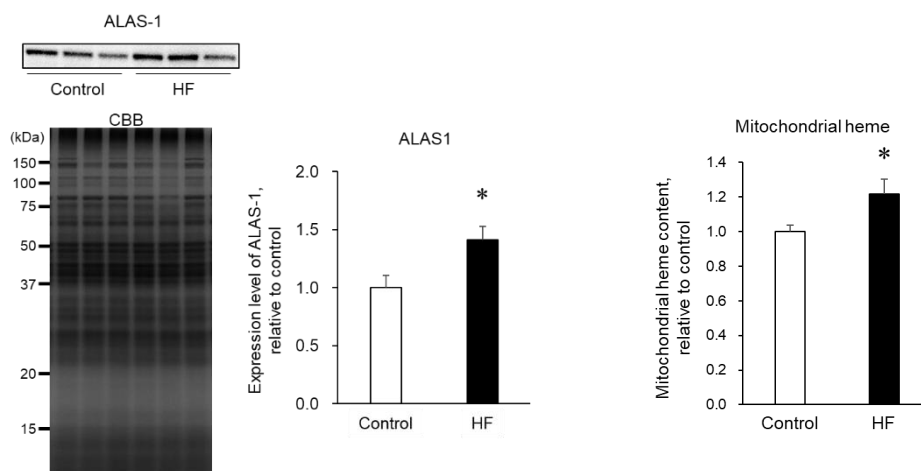


図 5-5. コントロール群, 心不全群のミトコンドリア当たりの ALAS-1 発現量の比較 (A). ミトコンドリアヘム量の比較 (B).

データは平均値±標準誤差 (n=6). * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.1.3.5. サクシニル CoA 量がミトコンドリアタンパク質のサクシニル化や complex II の機能に与える影響

単離ミトコンドリアへのアセチル CoA の添加はミトコンドリアタンパク質をアセチル化させることが報告された(Davies et al., 2016). これを参考に, 我々は C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアにサクシニル CoA を加えることでミトコンドリアタンパク質のサクシニル化を増加させることを明らかにした. 興味深いことに complex II の呼吸能は, ミトコンドリアに 10 mM のサクシニル CoA を加えたときには有意に低下したのに対し, 1 mM のサクシニル CoA を加えた時には逆に増加する傾向だった (図 5-6). このことから, サクシニル CoA の添加によるサクシニル化とミトコンドリア complex II 呼吸能は二峰性を示し, 過剰なサクシニル化はタンパク質の機能を低下させるが, 適度なサクシニル CoA を加えた時のサクシニル化はタンパク質が正常に機能するためには必要な修飾である可能性が考えられた.

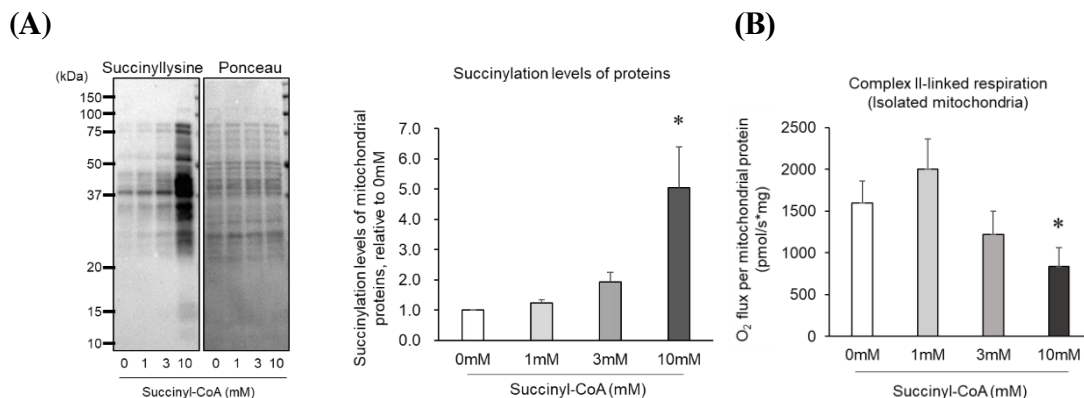


図 5-6. サクシニル CoA 量によるミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の変化 (A). サクシニル CoA 量による complex II 呼吸能の変化 (B).

データは平均値±標準誤差 (n=3-19). * $p < 0.05$ vs. 0 mM.

5.1.3.6. コントロール群, 心不全群におけるサクシニル化と complex II 機能の比較

心不全群はサクシニル CoA の低下とともに, ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は有意に低下するが, サクシニル CoA の添加により改善した. 現在までに唯一, 脱サクシニル化に働くことが知られている SIRT5 の発現量は心不全群での増加はなく, SIRT5 による脱サクシニル化の関与は否定的であった. Complex II 呼吸能はコントロール群に比較して心不全群で有意に低下し, 心不全群のミトコンドリアに 1 mM のサクシニル CoA を加えることで complex II 呼吸能は改善した (図 5-7).

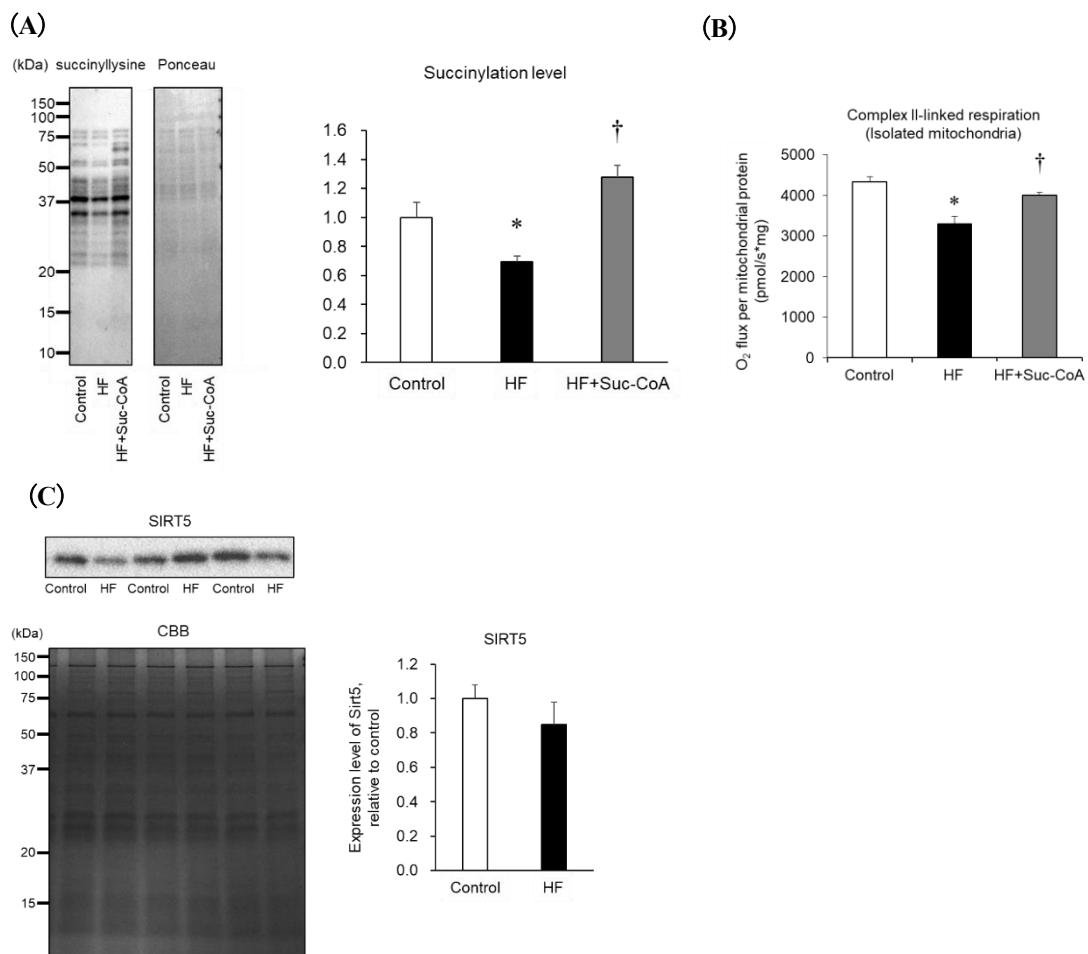


図 5-7. コントロール群, 心不全群, 心不全+サクシニル CoA 群のミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の比較 (A). コントロール群, 心不全群, 心不全+サクシニル CoA 群の complex II 呼吸能の比較 (B). コントロール群, 心不全群におけるミトコンドリア当たりの SIRT5 の発現量の比較 (C).

データは平均値±標準誤差 (n=3-10) . * $p < 0.05$ vs. control 群, † $p < 0.05$ vs. HF 群.

5.1.3.7. Complex II 機能不全によるサクシニル化の変化

これまでの結果から、心不全の心筋ではサクシニル CoA が TCA サイクル以外の経路で消費されるため (図 5-4, 5-5), サクシニル CoA やサクシニル化が減少すると推測している. しかしながら, TCA サイクルのみを考えると, complex II の機能低下によりサクシニル CoA や succinate は増加すると考えられる. この点を検証するために, siRNA で SDHA 遺伝子をノックダウンすることで Complex II 機能を抑制した際のサクシニル化を評価した. その結果, siSDHA 群ではサクシニル化は有意に増加した (図 5-8).

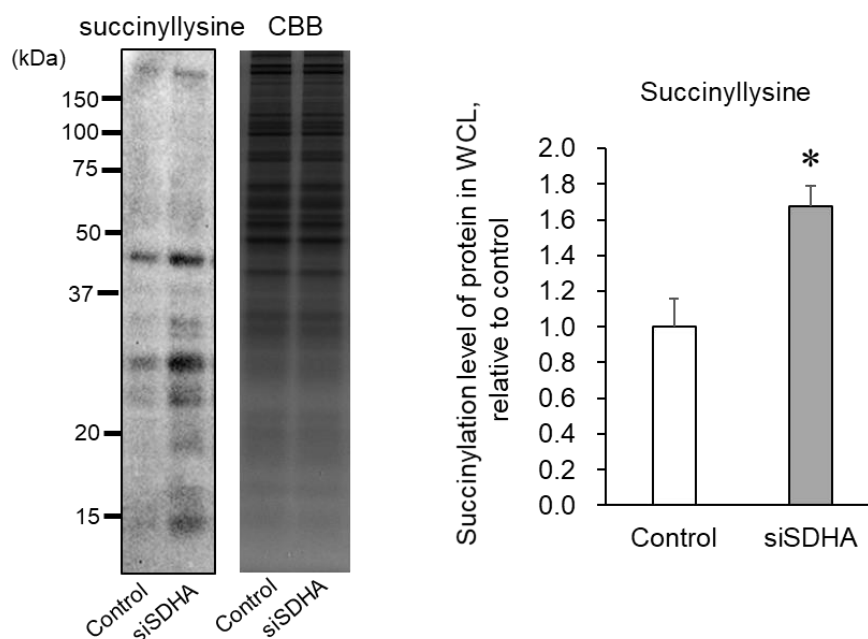


図 5-8. SDHA ノックダウンによる complex II 機能不全がサクシニル化に及ぼす影響.

データは平均値±標準誤差 (n=3). * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.1.3.8. コントロール群, 心不全群における complex II の発現量の比較

第2章の実験1で, ミトコンドリア complex II 呼吸能はミトコンドリア当たりの complex II 発現量により制御されうることを明らかにしたため (図 2-15), ミトコンドリア当たりの complex II の発現量をブルーネイティブ法で SDHA 抗体を使用して評価した. ミトコンドリア当たりの complex II の発現量は心不全群で有意に低下した. 心不全群のミトコンドリアにサクシニル CoA を加えても complex II の量は低下したままであった (図 5-9).

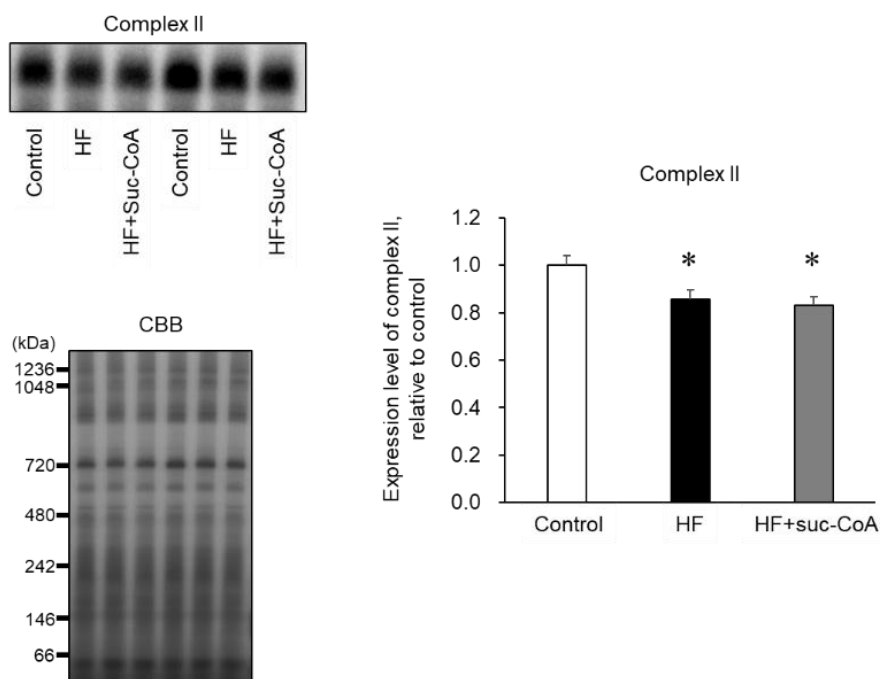


図 5-9. コントロール群, 心不全群, 心不全+サクシニル CoA 群のミトコンドリア当たりの complex II 発現量の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=6) . * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.1.3.9. コントロール群, 心不全群における complex I, IV の機能の比較

一方, complex I や complex IV の機能は, 心不全群にサクシニル CoA を加えても有意な変化はなかった (図 5-10).

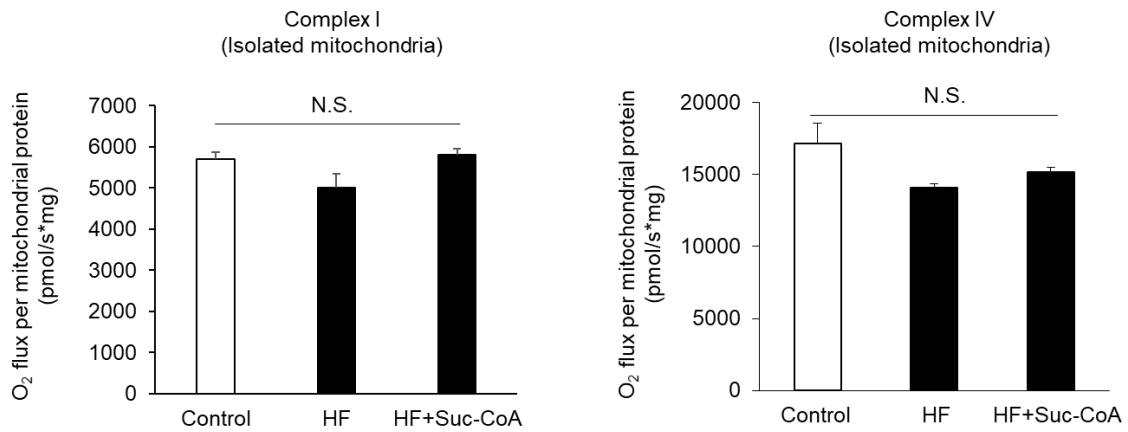


図 5-10. コントロール群, 心不全群, 心不全+サクシニル CoA 群の complex I, complex IV 呼吸能の比較.

データは平均値±標準誤差 (n=3). N.S. 有意差なし.

5.1.3.10. サクシニル化の低下が complex II 機能に与える影響

サクシニル化が低下した際の complex II の機能を評価するために、ミトコンドリアタンパク質を脱サクシニル化する方法を 5 つの実験にて検討した。

まず、脱サクシニル化に働くことが知られている SIRT5 を単離したミトコンドリアに加えて反応させた。SIRT5 は NAD⁺ 依存的に働く酵素であるため、NAD⁺ も同時に加えた。脱サクシニル化の反応を促進するために succinyl-CoA を添加しサクシニル化を増やした状態でも検討した。しかしながら予想に反して SIRT5 を加えてもサクシニル化は変化しなかった (図 5-11)。図 5-7 に示したように心不全群のミトコンドリアタンパク質のサクシニル化に SIRT5 の関与が大きくないことと同様の結果であった。

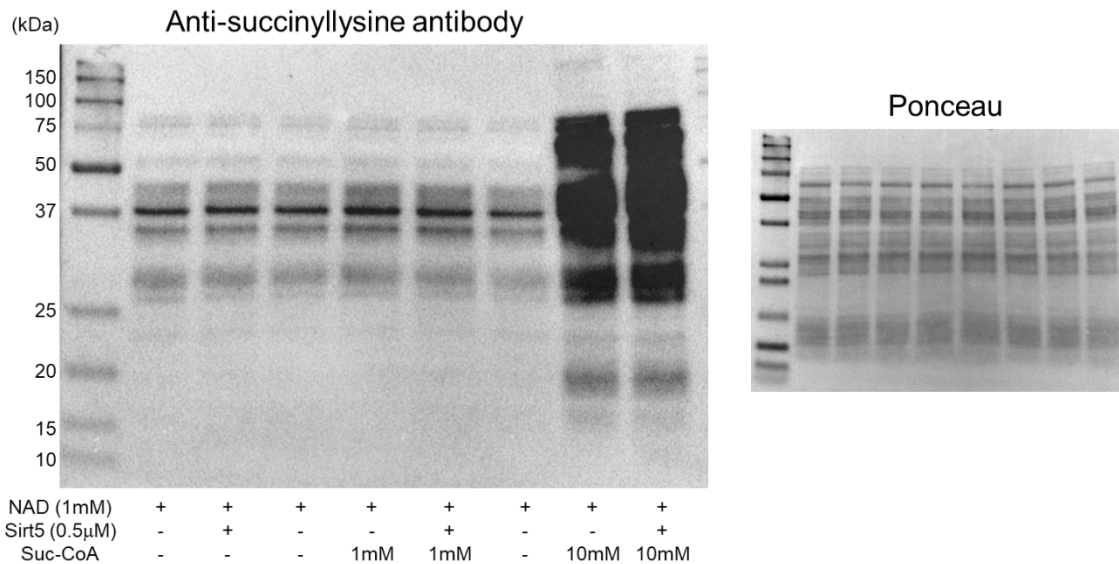


図 5-11. C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアに SIRT5 を加えた時のサクシニル化の変化。

次に、サクシニル化はリジン残基に起こる反応であるため、リジンを飽和させることによりタンパク質のリジン残基のサクシニル化を減らせると仮説を立て、検証した。リジンを 1 mM, 10 mM 加えて反応させたが、タンパク質のサクシニル化レベルに変化はなかった (図 5-12)。

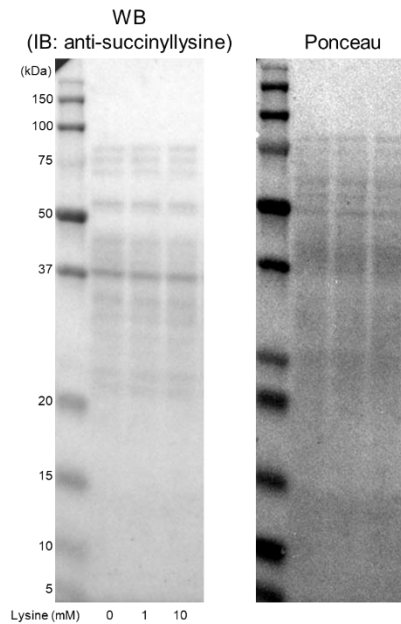


図 5-12. C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアにリジンを加えた時のサクシニル化の変化。

3つ目の実験として、アセチル化を亢進することによりタンパク質を脱サクシニル化した研究が報告されていたため(Quant et al., 1990), この論文を参考にして同様の実験を行った. Desuccinylation medium 内で, 単離したミトコンドリアに Acetyl-CoA (0.1 mM, 1 mM) を添加することで脱サクシニル化が亢進すると報告されていたが, 本実験ではサクシニル化の低下はなかった (図 5-13).

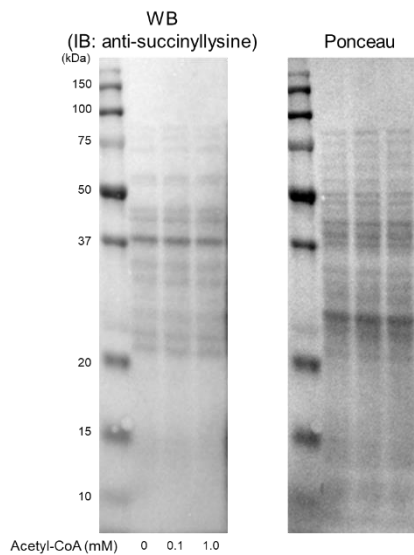


図 5-13. C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアに Acetyl-CoA を加えた時のサクシニル化の変化.

単離ミトコンドリアで脱サクシニル化反応を起こすのが困難であったため、4つ目の実験として、心筋培養細胞（H9c2 細胞）を使用して脱サクシニル化を試みた。過去の報告(Chen et al., 2017)を参考に、2-DG 15 mM, IAA 5 μ M, TA9 5 μ M をそれぞれ加えて 20 分間培養したが、サクシニル化は低下しなかった (図 5-14)。

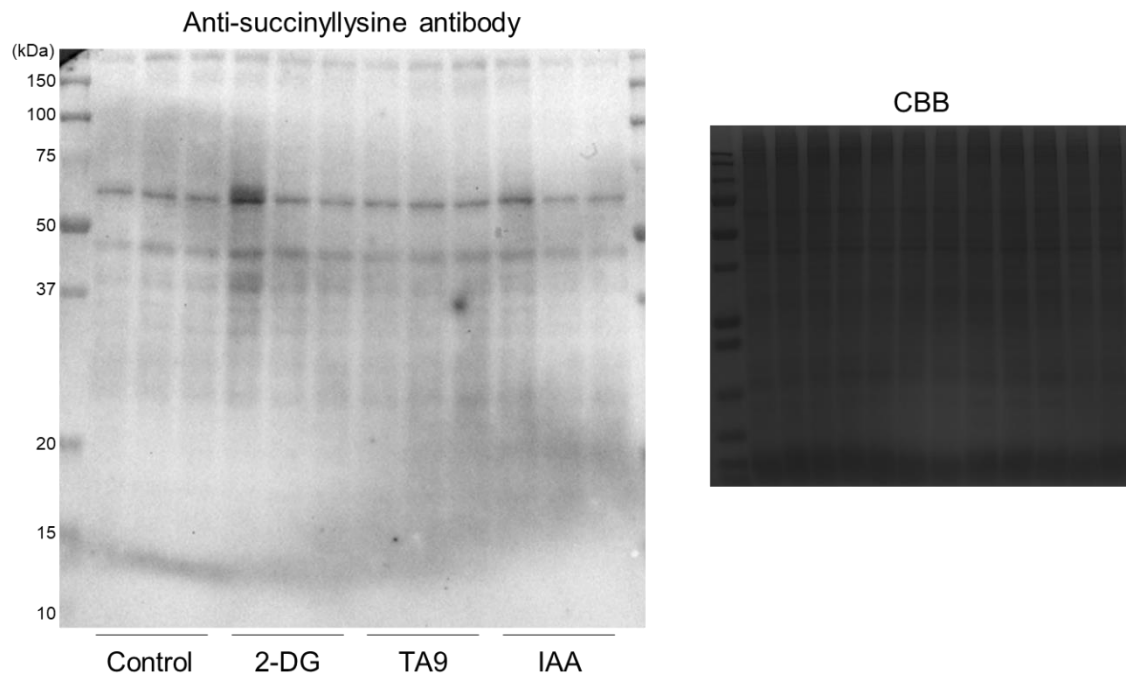


図 5-14. H9c2 細胞に 2-DG, IAA, TA9 を加えて培養した際のミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の変化.

最後に5つ目の実験として、ヘム合成の過程でグリシンとサクシニル CoA が反応して ALA が合成されるため (図 5-1), この反応を促進することでサクシニル CoA が消費されると仮説を立て検証した. H9c2 細胞を, 培養液にグリシンを加えて培養するとミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は有意に低下した. この細胞を回収して単離したミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化は増加した. また, complex II 機能はサクシニル化に伴って改善した. すなわち, グリシンを加えて培養した際にサクシニル化および complex II 機能は低下し, サクシニル CoA を加えることで増加した (図 5-15). これらの結果からサクシニル化の低下が complex II の機能低下に関与することが示唆された.

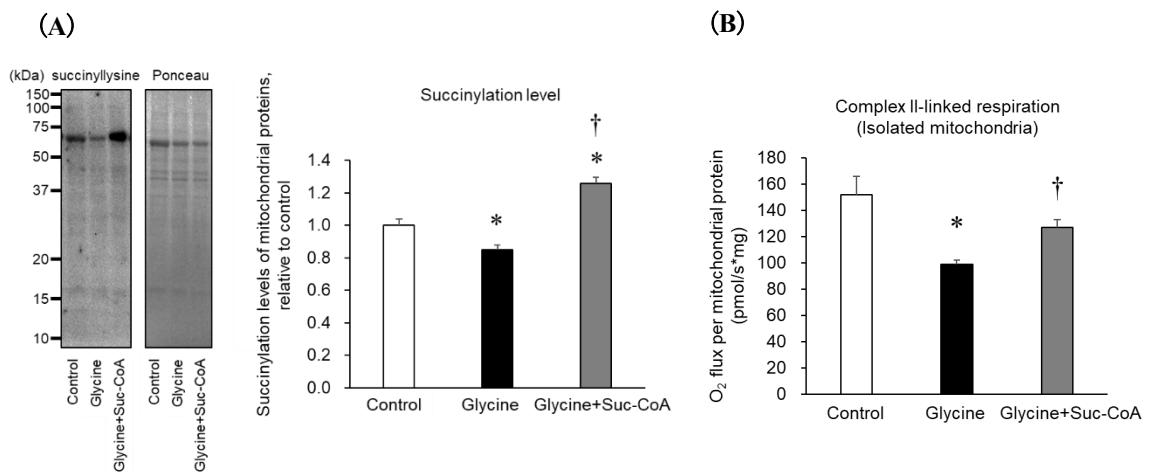


図 5-15. コントロール群, グリシン群, グリシン+サクシニル CoA 群のミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の比較 (A). コントロール群, グリシン群, グリシン+サクシニル CoA 群の complex II 呼吸能の比較 (B). データは平均値±標準誤差. (n=4-8). * $p < 0.05$ vs. control 群, † $p < 0.05$ vs. glycine 群.

5.1.3.11. Complex II のサクシニル化部位の評価

ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が complex II の機能制御に重要であることが示されたが、どのタンパク質がサクシニル化の治療標的となるかは不明である。Complex II の機能はサクシニル化によって変化したのに対し、complex I や complex IV の機能は変化しなかったため、complex II 自体がサクシニル化されている可能性が高いと考え、complex II のサクシニル化を評価した。

C57BL/6J マウスの心筋ミトコンドリアを complex II に対する抗体で免疫沈降し、各サブユニットの抗体でブロッキングした。各サブユニットの発現が確認できたため、サクシニルリジンに対する抗体でブロッキングし、サクシニル化を評価したところ、SDHA と SDHB が検出された (図 5-16)。

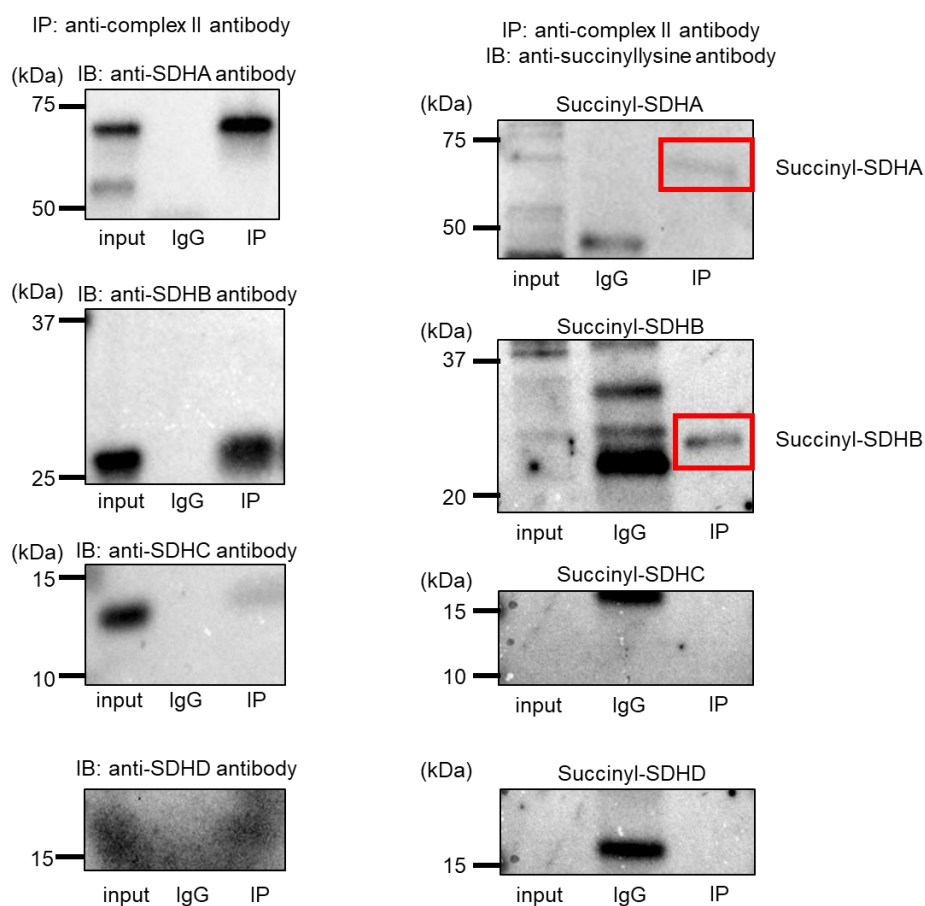


図 5-16. C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアにおける免疫沈降結果. Complex II に対する抗体で immunoprecipitation (IP) し、SDH サブユニットでブロッキングした結果. Complex II に対する抗体で IP し、succinyllysine に対する抗体でブロッキングした結果.

5.1.3.12. コントロール群, 心不全群における SDHA, SDHB のサクシニル化の比較

図 5-16 の結果を基に, コントロール群, 心不全群, 心不全+サクシニル CoA 群の 3 群で, 心筋ミトコンドリアをサクシニルリジンの抗体で免疫沈降し, SDHA, SDHB の抗体でブロッティングした. しかしながら, いずれも有意な変化はなかった (図 5-17).

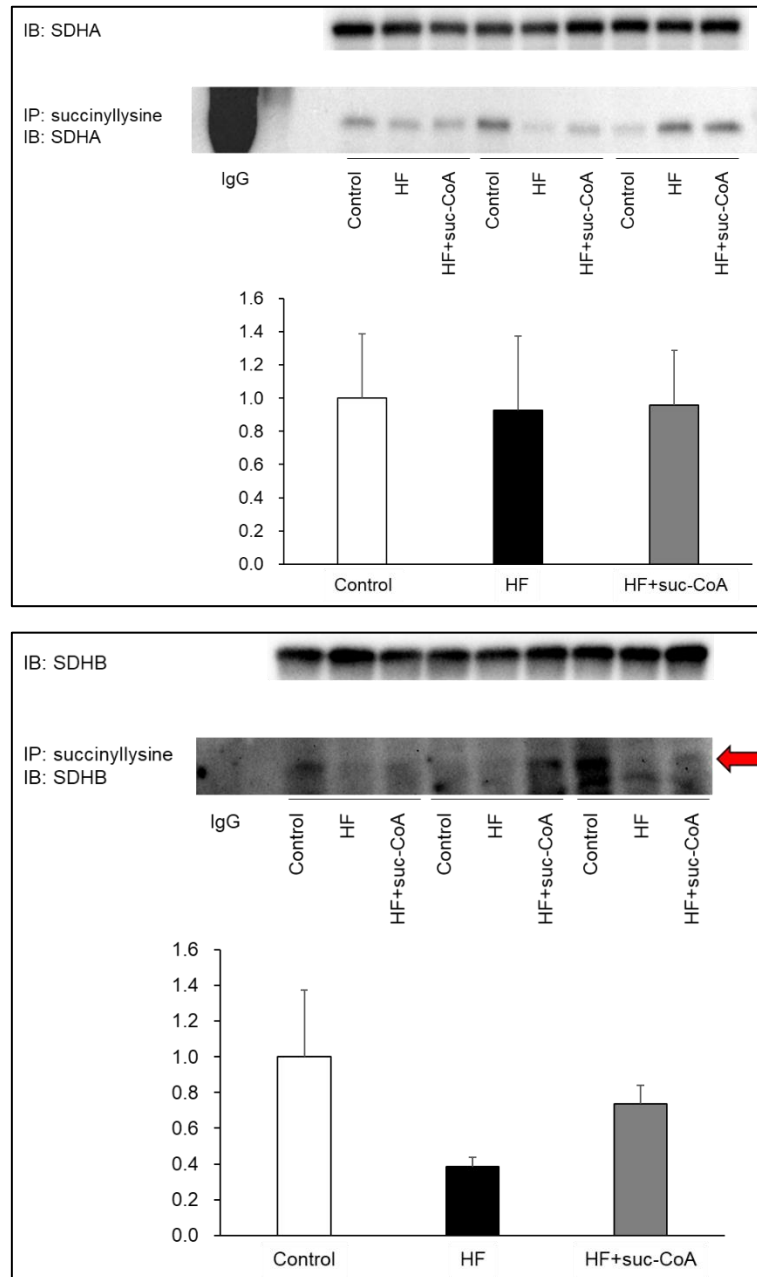


図 5-17. コントロール群, 心不全群, 心不全+suc-CoA 群における succinyl-SDHA, succinyl-SDHB の比較. データは平均値±標準誤差 (n=4~8).

5.1.4. 考察

心筋梗塞後心不全の慢性期の解析で、サクシニル CoA の低下やミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下し、これらの変化が **complex II** の機能不全の原因と考えられた。さらに、ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えることでサクシニル化の増加を介して、**complex II** の機能を改善させた。

過去の報告(Bedi et al., 2016)と同様にサクシニル CoA は心不全群で低下した (図 5-2)。サクシニル CoA は TCA サイクルのみでなく、ケトン代謝やヘム合成などの経路にも関与する (図 5-1)。心筋組織でのケトン体が低下し (図 5-4)、血中でのケトン体が増加した (図 5-5) ことから心不全群においてケトン代謝が亢進していることが示唆された。また、ミトコンドリアヘムは増加しており、ヘム合成の亢進が考えられた。これらの結果は過去の報告と同様の結果であった(Bedi et al., 2016; Khechaduri et al., 2013)。サクシニル CoA はこれらの経路の亢進により消費され、その結果、心不全群でサクシニル CoA が低下するものと推測された。TCA サイクルにおいてサクシニル CoA を succinate と CoA に変換する酵素である SUCLA2 や SUCLG1 の発現は増加しておらず (図 5-3)、これらの機能亢進によってサクシニル CoA が減少したということではないと考えられる。また、siRNA により SDHA をノックダウンさせることで **complex II** の機能を低下させるとミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は増加した (図 5-8)。この結果は、心不全では単純に **complex II** の機能が低下しているだけではなく、上述したケトン代謝やヘム合成経路の亢進が関与していることを裏付けるものと言える。

サクシニル化はタンパク質翻訳後修飾の 1 つであり、sirtuin 5 (SIRT5) という脱サクシニル化に働くタンパク質とサクシニル CoA により制御されていると考えられている。サクシニル CoA はリジン残基へのサクシニル基のドナーとなり (Weinert et al., 2013)、一方で SIRT5 により脱サクシニル化される(Sadhukhan et al., 2016)。本研究では、ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は心不全群で有意に低下することを明らかにした (図 5-7)。一方で、SIRT5 の発現量には有意差はなく (図 5-7)、心不全群での増加はなかったため、心不全群でのサクシニル化の低下は SIRT5 の機能亢進によるものではなく、サクシニル CoA の低下によるものであると考えられた。実際、心不全群のミトコンドリアへのサクシニル CoA の補充はサクシニル化を増加させた (図 5-7)。

サクシニル化は側鎖の正電荷を負電荷に変化させるため(Sadhukhan et al., 2016)、タンパク質の構造や機能を変化させ得る。これまでにサクシニル化とタンパク質の機能に関していくつか報告がある(Sadhukhan et al., 2016; Zhang et al., 2017)。これらの研究では SIRT5 の欠損マウスによりタンパク質が過剰にサクシニル化された際

のタンパク質機能を評価している。Zhang らは SIRT5 欠損マウスの肝臓ミトコンドリアでミトコンドリアタンパク質が過剰にサクシニル化され、complex II の呼吸能が低下したと報告した(Zhang et al., 2017)。しかし、このような過剰なサクシニル化は生理的条件下で起こり難いものである。今回の研究では、C57BL/6J マウスの心筋から単離したミトコンドリアに 10 mM のサクシニル CoA を加えたところ complex II の機能は低下した (図 5-6)。10 mM のサクシニル CoA を加えたミトコンドリアタンパク質は著明にサクシニル化されており、これは SIRT5 欠損による過剰なサクシニル化と同等であると推測された。一方で、1 mM のサクシニル CoA を加えたミトコンドリアの complex II の呼吸能は増加傾向であった (図 5-6) ことから、タンパク質が正常に機能するために適度なサクシニル化が必要であると考えられた。

正常なタンパク質の機能に適度なサクシニル化が必要であると考えられたことから、サクシニル化を減少させたときにタンパク質の機能が低下すると予測され、この仮説を検証するための実験を行った。C57BL/6J マウスの心筋ミトコンドリアを用いて、サクシニル化を減少させる方法を検討した。まず、recombinant SIRT5 をミトコンドリアに加えて脱サクシニル化を試みたが、サクシニル化は減少しなかった (図 5-11)。この recombinant は human のものであるためマウスでは機能しなかった可能性がある。次に、サクシニル化修飾を受けるのがリジン残基であるため、「リジン残基を飽和させた環境下ではタンパク質のサクシニル化は減少する」と仮説を立てた。リジン残基を加えるとアルカリ側に傾き pH が 10 以上となったため、タンパク質構造への影響を考慮し、塩酸を加えて pH を調整した。仮説に反して、リジン残基を加えてもサクシニル化に有意な変化はなかった (図 5-12)。リジン残基を飽和させることで新たなサクシニル化修飾は防いでも、タンパク質からサクシニル基を外すことはできないのかもしれない。Quant らは acetyl-CoA を含む buffer にタンパク質を溶解することで脱サクシニル化しており(Quant et al., 1990)、この文献を参考に desuccinylation medium を作製し acetyl-CoA を加えたが、やはりサクシニル化に変化はなかった (図 5-13)。単離ミトコンドリアの脱サクシニル化がうまくいかなかったため、培養細胞を使った方法を試みた。Chen らは、2-DG を培養液に加えて 20 分培養するとタンパク質のサクシニル化が減少したと報告しており(Chen et al., 2017)、同様の方法で脱サクシニル化を試みたが、サクシニル化は変化しなかった (図 5-14)。次に、ヘム合成過程の初期反応でグリシンとサクシニル CoA が反応し ALA を合成する反応があるため (図 5-1)、グリシンを加えることでこの過程を亢進させることができるのではないかと考えた。過去の報告(Li et al., 2015)と同様に、培養液にグリシンを加えて細胞を培養した。この細胞を回収し

てミトコンドリアを単離したところミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は減少した。このサクシニル化が低下した単離ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化は増加した (図 5-15)。Complex II 呼吸能は、グリシンを加えて脱サクシニル化させた際に低下し、サクシニル CoA を加えてサクシニル化を再度増加させることで改善した (図 5-15)。この結果から、ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化の減少が complex II の機能低下と関連することが示唆された。

サクシニル化の減少が complex II 機能低下と関連することが示唆されたため、心不全群のミトコンドリアのサクシニル化を増加させることで complex II の機能を改善することができると考えられた。そこで、心不全マウスの心筋ミトコンドリアに 1 mM の succinyl-CoA を加えて complex II 機能を測定したところ complex II の機能は心不全群と比較して有意に改善した (図 5-16)。サクシニル CoA は TCA サイクルで、complex II の基質である succinate に変換されることから、サクシニル CoA を加えた際の complex II 機能改善は基質である succinate の増加によるものである可能性も否定しきれない。この点を明らかにするため、complex II の機能を測定する際に、いずれの群においても succinate が飽和した状態で測定した (図 2-11)。ミトコンドリア呼吸能の増加がみられなくなるまで succinate を一定量ずつ加えていき、呼吸能の最大値を評価した。この方法においても心不全のミトコンドリアにサクシニル CoA を加えたことにより complex II の機能は有意に改善した。この結果から、サクシニル CoA による complex II 機能改善は succinate 量の増加には依存したものではないと考えられた。

ミトコンドリア当たりの complex II の発現量は、心不全群で有意に低下し、サクシニル CoA を加えても変化はなく (図 5-9)、complex II 機能改善は complex II 発現量の増加によらないことが示唆された。適度なサクシニル化は complex II の会合ではなく電子伝達の効率性に関与しているのかもしれない。また、心不全群で complex II の発現量が低下しており、サクシニル化以外に complex II 発現量低下を介して機能を低下させる要因があると考えられた。

サクシニル CoA を加えても complex I や complex IV の機能に有意な変化はなかった (図 5-10) ことから、サクシニル化のターゲットタンパク質は complex II 自身である可能性が高いと考えられた。そこで、complex II のサクシニル化について評価した。C57BL/6J マウス心筋ミトコンドリアを complex II に対する抗体で免疫沈降し、サブユニットの発現を確認した後、サクシニルリジンの抗体でブロットニングしたところ SDHA と SDHB が検出され、SDHC や SDHD は検出されなかった

(図 5-16)。このことから complex II のサブユニットのうち SDHA と SDHB がサクシニル化を受けていることが示唆された。次に、コントロール群、心不全群、心不

全にサクシニル CoA を加えた群の 3 群のミトコンドリアで、サクシニルリジンの抗体で免疫沈降したサンプルを SDHA, SDHB の抗体でブロットイングした。ばらつきが大きく n が少ないが、SDHB は心不全群で低下し、サクシニル CoA を加えて増加する傾向だった (図 5-17)。さらなる評価は必要であるが、現時点では complex II のうち SDHB のサクシニル化が重要であることが示唆された。

本研究では、complex II の機能を改善することができたものの、この機能改善が心機能や予後の改善に結びつくかどうかは明らかにできていない。また、本研究で complex II を改善した方法はミトコンドリアを単離した後にサクシニル CoA を加えるという *ex vivo* の方法であり、*in vivo* に応用できていない。これらの点は今後の課題である。

ミトコンドリア機能と心機能の関係についてはこれまでに複数の報告がある。例えば、Huang らは、ドキシソルビシンによる心毒性に対して自然化合物であるホノキオールがミトコンドリア機能の低下を予防し、心保護作用を示した (Huang et al., 2017)。また、Gomes らは、心筋梗塞後心不全ラットに対して ALDH2 を活性化させることでミトコンドリア機能と心機能の低下を予防した (Gomes et al., 2014)。これらの報告のようにミトコンドリア機能を改善させることで心機能や予後が改善できる可能性は高く、complex II の機能改善は心不全治療の 1 つの方法になり得るものである。

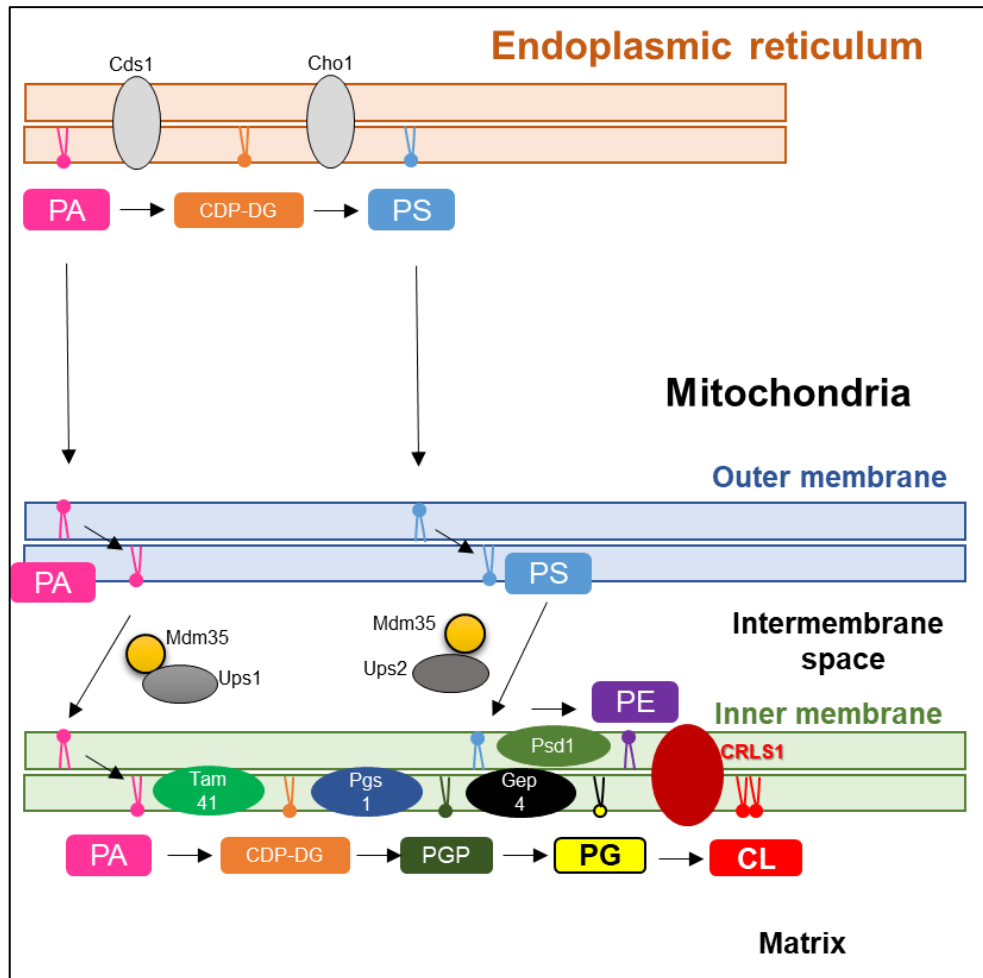
5.2. 実験6：コントロール群，心不全群におけるカルジオリピンの比較と complex II 呼吸能との関連.

5.2.1. 緒言

実験5では心筋ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化低下が complex II 機能低下の一因であることが明らかになったが，サクシニル化の低下は complex II 発現量低下には寄与していなかった．心不全群の心筋ミトコンドリアでは complex II の発現量が低下しており，complex II 発現量低下の原因は別にあると考えられた．実験3で示したように慢性期においては complex II のサブユニットや会合因子の発現量は低下していなかったことから，complex II 発現量低下の原因として complex II の材料不足や complex II 会合不全ではなく，一度つくられた complex II の不安定化や分解亢進の可能性が高いと考えた (図 4-1)．

ミトコンドリア内膜にはミトコンドリア内膜特異的なリン脂質であるカルジオリピンが存在する．カルジオリピンの合成過程を既報(O'Neill, 2013)を参考に図 5-18 にまとめた．カルジオリン合成の原材料であるホスファチジン酸 (PA) は小胞体でつくられ，小胞体からミトコンドリアの外膜へ運ばれる．その後，Ups1-Mdm35 複合体によりミトコンドリア外膜から内膜へ輸送される．CDP-DAG 合成酵素によりホスファチジン酸に CDP が付加され CDP-DAG が生成する．ミトコンドリア内膜のホスファチジルグリセロン酸合成酵素により CDP-DAG はグリセロール 3 リン酸と縮合し，ホスファチジルグリセロン酸 (PGP) となる．PGP は PGP ホスファターゼによりカルジオリピン (CL) の前駆体であるホスファチジルグリセロール (PG) となる．PG はカルジオリピン合成酵素 (CRLS) により CDP-DAG と縮合し CL が生成する．

このカルジオリピンは complex II の安定化に重要であり (Schwall et al., 2012)，心不全においてカルジオリピン量が低下することが報告されている (Mulligan et al., 2012)．これらのことから，「心不全においてカルジオリピン量の低下が complex II の不安定化を招き，結果として complex II の発現量が低下する」という仮説を立て，これを実験6で検証した．



PA: phosphatidic acid
 CDP-DG: CDP-diacylglycerol
 PS: phosphatidylserine
 PE: phosphatidylethanolamine
 PGP: phosphatidylglycerol phosphate
 PG: phosphatidylglycerol
 CL: cardiolipin

図 5-18. カルジオリピンの合成過程

5.2.2. 方法

5.2.2.1. 心不全モデルマウスの作製

3.2.1.と同様の方法で心不全モデルマウスを作製した。慢性期の評価のため28日後に心臓を摘出した。

5.2.2.2. 組織からのミトコンドリア単離

2.1.2.2.と同様の方法でミトコンドリアを単離した。

5.2.2.3. ミトコンドリアタンパク質濃度測定

2.1.2.2.と同様の方法でタンパク質濃度を測定した。

5.2.2.4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.1.2.5.と同様の方法で行った。

5.2.2.5. カルジオリピン解析 (液体クロマトグラフィー)

5 μ l のサンプルを Nexera X2, Q-Exactive mass spectrometer に注入し, Accucore C18 カラム (150 \times 2.1 mm, 2.6 μ m) を使用した逆相液体クロマトグラフィーによって分離した。移動相は (A) 水 : アセトニトリル 60 : 40, 10 mM ギ酸アンモニウム, 0.1%ギ酸, (B) イソプロパノール : アセトニトリル 90 : 10, 10 mM ギ酸アンモニウム, 0.1%ギ酸, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C, グラジエント条件は下記の通りとした : 流速 0.3 ml/min ; 0-1.5 分, 32%B; 1.5-6 分, 32-58%B; 6-18 分, 58-75%B; 18-21 分, 75-97%B; 21-25 分, 97%B; 25.1-35 分, 32%B. 陰イオンモードのエレクトロスプレーイオン化に関するパラメータは下記の通りとした : sheath gas 流速 40, auxiliary gas 流速 10, スプレー電圧 2.5 kV, capillary 温度 350 $^{\circ}$ C, heater 温度 300 $^{\circ}$ C. Q-Exactive mass spectrometer はフルスキャンモード, 質量分解能 70,000 とした (scan range: 200-2000 m/z, automatic gain control target: $1e^6$, maximum ion injection time: 250 msec). データ解析は LipidSearch software を使用して行った。

5.2.2.6. 統計学的解析

統計処理は, GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った。データは, 平均値 \pm 標準誤差で示した。2群間の平均値の差の検定はスチューデントの *t* 検定で行った。 *P*-values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

5.2.3. 結果

5.2.3.1. コントロール群と心不全群における心筋ミトコンドリア当たりのリン脂質の比較.

ミトコンドリア合成過程の各リン脂質の心筋ミトコンドリア当たりの量をコントロール群, 心不全群で比較した. PA (ホスファチジル酸) から PG (ホスファチジルグリセロール) までは両群間に差がないものの, CL は心不全群で有意に低下した (図 5-18).

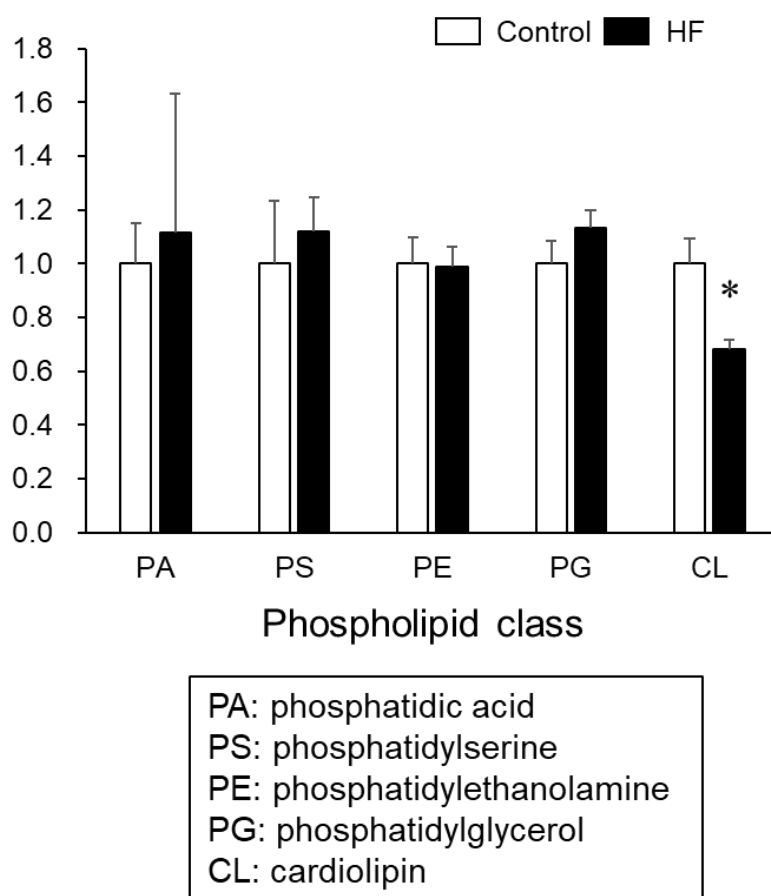


図 5-18. コントロール群と心不全群における単離ミトコンドリア当たりのカルジオリピンの比較. データは平均値±標準誤差 (n=4). * $p < 0.05$ vs. control 群.

5.2.3.2. コントロール群と心不全群における CRLS1, PLD6 の発現量の比較.

カルジオリピンの合成に働く酵素である CRLS1, 分解に働く PLD6 のミトコンドリア当たりの発現量をコントロール群と心不全群で比較した. CRLS1 はばらつきが大きく有意差はなかったものの心不全群で低下傾向を示した. ばらつきが大きかったため, mRNA レベルでも評価したところ, 心不全群で有意に低下した (図 5-19).

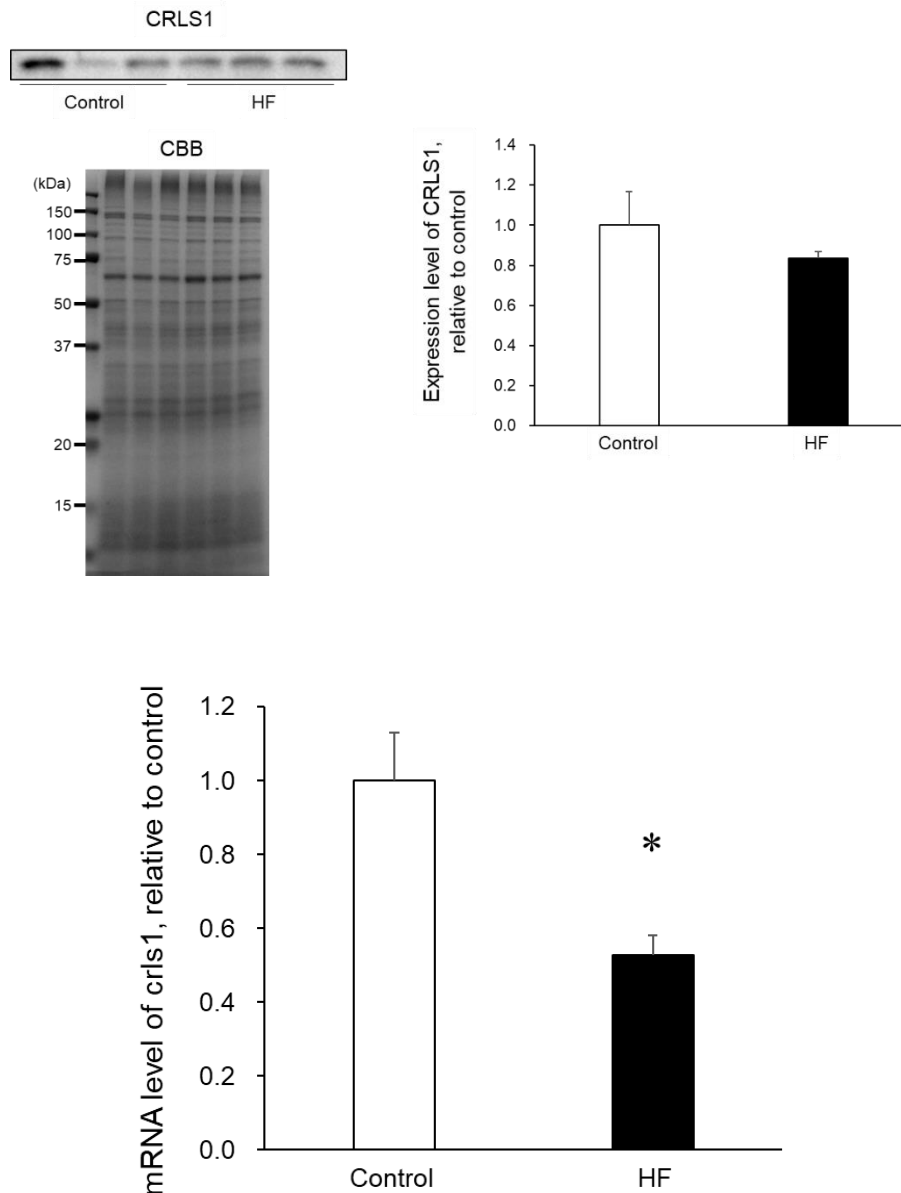


図 5-19. コントロール群と心不全群における CRLS1 の mRNA, タンパク質レベルの発現量の比較. データは平均値±標準誤差 (n=5~6). * $p < 0.05$ vs. control 群.

ミトコンドリア当たりの PLD6 の発現量は心不全群で低下傾向があったが、両群間に有意差は無かった (図 5-20)。

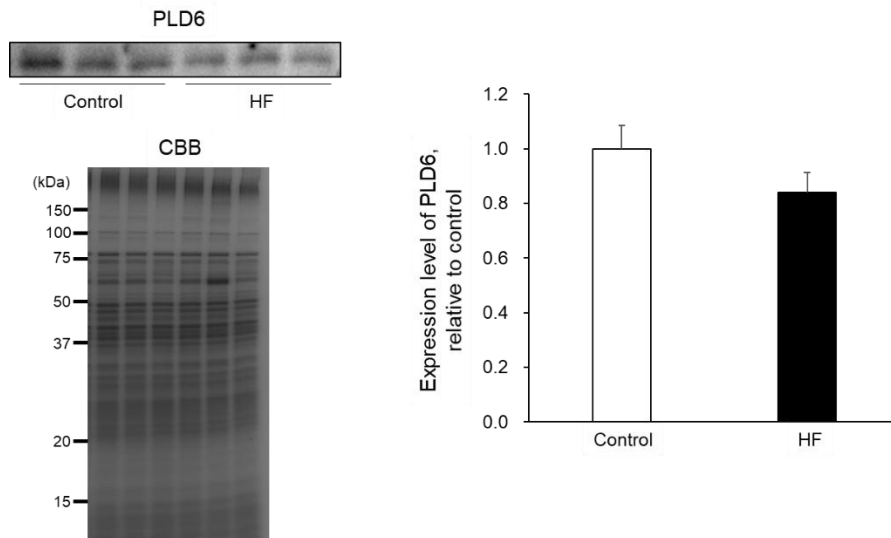


図 5-20. コントロール群と心不全群における単離ミトコンドリア当たりの PLD6 の発現量の比較. データは平均値±標準誤差 (n=6).

5.2.4. 考察

ミトコンドリア当たりの CL (カルジオリピン) は心不全群で有意に低下しており (図 5-18), これは過去の報告と一致する結果だった(Mulligan et al., 2012). カルジオリピンの合成過程において上流の脂質である PE や PG はコントロール群と心不全群で差がなかった (図 5-18) ことから, カルジオリピンが減少した原因は, PG から CL の合成低下, もしくは CL の分解亢進が考えられた. CL の分解に関与するタンパク質である PLD6 は心不全群で増加しなかった (図 5-20). 一方, PG から CL の合成に働く CRLS1 はタンパク質レベルではばらつきが大きく評価が困難であったが, mRNA レベルでは有意に低下した (図 5-19). これらのことから, PG から CL への合成が抑制されたため CL が低下したと考えられた.

本研究では, CL の低下と complex II 発現量や呼吸能低下の関連を明らかにすることはできなかったが, これまでに complex II の安定化に CL が重要な役割を果たしていることが報告されており(Schwall et al., 2012), CL の低下が complex II 発現量や呼吸能低下に関与している可能性は十分に考えられる.

今後, CRLS1 ノックダウンにより CL 合成を低下させた細胞で complex II 発現量や呼吸能を評価する. これにより CL 低下と complex II 発現量や呼吸能の関連が示唆された場合, 心不全マウスに CL の材料となるリノール酸やオレイン酸を多く含む食餌を与え, CL 量や complex II 発現量, 機能が改善するかどうかを評価する予定である.

第6章：総括および結論

・本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる。

1. C57BL/6J マウスの心筋，骨格筋ミトコンドリアにおいて complex II 呼吸能は complex I の呼吸能に匹敵した。
2. 心筋梗塞後心不全マウスにおいて，心筋ミトコンドリアの complex II の発現量，呼吸能はコントロール群と比較して早期から慢性期にかけて低下した。
3. 心筋梗塞後心不全マウスの早期に，心筋ミトコンドリアの complex II サブユニットや会合因子の発現量は有意に低下した。これらは慢性期には低下しなかった。
4. 低酸素モデルの細胞から単離したミトコンドリアでは complex II サブユニットや会合因子の発現量は低下し，complex II の発現量，呼吸能が低下した。
5. 心筋梗塞後心不全マウスの慢性期には，心筋のサクシニル CoA 量，ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化レベルは低下した。このミトコンドリアに succinyl-CoA を添加すると，サクシニル化は増加し，complex II 呼吸能は改善した。Succinyl-CoA を添加した際に，complex II 発現量の改善はなかった。
6. 培養細胞にグリシンを加えることでミトコンドリアタンパク質のサクシニル化は低下し，complex II の機能は低下した。Succinyl-CoA を加えるとサクシニル化，complex II 機能ともに改善した。

結論として，ミトコンドリアの ATP 産生において complex II の果たす役割は complex I と匹敵して重要であることが示唆された。心筋梗塞後急性期においては心筋組織の低酸素により complex II サブユニットや会合因子のミトコンドリア内の発現量低下し，complex II の発現量や機能が低下した。心筋梗塞後慢性期には心筋組織のサクシニル CoA が減少し，ミトコンドリアタンパク質のサクシニル化が低下した。これらが complex II の機能低下の一因であると考えられ，ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えることでサクシニル化の増加とともに complex II の機能は改善した。サクシニル CoA やサクシニル化が慢性心不全の治療ターゲットになり得ると考えられた。

今後，in vivo の実験で，心不全マウスにサクシニル CoA を補充した際に，ミトコンドリア機能が改善し，心機能や予後が改善するかを検証したいと考えている。

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり、本研究の機会を与えて頂くとともに、多くの御指導と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 筒井裕之前教授に深謝申し上げます。また、2017年9月より新たに教授に就任され、ご指導いただきました安斉俊久教授に感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 博士研究員 高田真吾先生には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝しております。

本研究に当たり、日頃より多くの御指導・御助力を頂きました北海道大学大学院医学研究院 循環病態内科学教室、絹川真太郎講師、降旗高明先生、南部秀雄先生、角谷尚哉先生、白川亮介先生、片山貴史先生、尾畑嘉一先生、山梨克真先生、仲野一平先生、津田正哉先生、松本純一先生、中島孝之先生、齋藤晶理先生、福島新助教、横田卓助教に感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として質量分析の実験に御助力頂きました九州大学大学院医学研究院臨床検査医学 康東天教授、瀬戸山大樹助教、植柳泰先生、ならびに北海道大学大学院医学研究院医化学教室 畠山鎮次教授、渡部昌講師に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として電子顕微鏡撮像に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院組織細胞学教室 小林純子講師に深く感謝申し上げます。

本研究において、貴重な御指導・御助言を頂き、データ解析に御助力を頂きました北海道大学医学研究院分子生物学教室 佐邊壽孝教授、及川司講師、半田悠先生、ならびにがん研究会 がんプレシジョン医療研究センター 植田幸嗣先生に深く感謝申し上げます。

また本論文作成に当たり、御多忙の中御助言頂きました審査委員の先生に深く感謝いたします。

本研究の実験遂行にあたり、多大な御助力を頂きました循環病態内科学講座実験助手の山根美和子様、木村友紀様、また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Alston, C.L., Davison, J.E., Meloni, F., van der Westhuizen, F.H., He, L., Hornig-Do, H.T., Peet, A.C., Gissen, P., Goffrini, P., Ferrero, I., *et al.* (2012). Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* *49*, 569-577.
- Ando, H., Takamura, T., Ota, T., Nagai, Y., and Kobayashi, K. (2000). Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Pharmacol Exp Ther* *294*, 1043-1046.
- Aubert, G., Martin, O.J., Horton, J.L., Lai, L., Vega, R.B., Leone, T.C., Koves, T., Gardell, S.J., Kruger, M., Hoppel, C.L., *et al.* (2016). The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel. *Circulation* *133*, 698-705.
- Bayeva, M., Gheorghide, M., and Ardehali, H. (2013). Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J Am Coll Cardiol* *61*, 599-610.
- Bedi, K.C., Jr., Snyder, N.W., Brandimarto, J., Aziz, M., Mesaros, C., Worth, A.J., Wang, L.L., Javaheri, A., Blair, I.A., Margulies, K.B., *et al.* (2016). Evidence for Intramyocardial Disruption of Lipid Metabolism and Increased Myocardial Ketone Utilization in Advanced Human Heart Failure. *Circulation* *133*, 706-716.
- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* *279*, 36562-36569.
- Birch-Machin, M.A., Taylor, R.W., Cochran, B., Ackrell, B.A., and Turnbull, D.M. (2000). Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann Neurol* *48*, 330-335.
- Bristow, M.R., Saxon, L.A., Boehmer, J., Krueger, S., Kass, D.A., De Marco, T., Carson, P., DiCarlo, L., DeMets, D., White, B.G., *et al.* (2004). Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* *350*, 2140-2150.
- Busk, M., Toustrup, K., Sorensen, B.S., Alsner, J., Horsman, M.R., Jakobsen, S., and Overgaard, J. (2011). In vivo identification and specificity assessment of mRNA markers of hypoxia in human and mouse tumors. *BMC Cancer* *11*, 63.
- Capaldi, R.A., Halphen, D.G., Zhang, Y.Z., and Yanamura, W. (1988). Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* *20*, 291-311.
- Chen, H., Xu, H., Potash, S., Starkov, A., Belousov, V.V., Bilan, D.S., Denton, T.T., and Gibson, G.E. (2017). Mild metabolic perturbations alter succinylation of mitochondrial proteins. *J*

Neurosci Res 95, 2244-2252.

Covington, J.D., Tam, C.S., Bajpeyi, S., Galgani, J.E., Noland, R.C., Smith, S.R., Redman, L.M., and Ravussin, E. (2016). Myokine Expression in Muscle and Myotubes in Response to Exercise Stimulation. *Med Sci Sports Exerc* 48, 384-390.

Davies, M.N., Kjalarsdottir, L., Thompson, J.W., Dubois, L.G., Stevens, R.D., Ilkayeva, O.R., Brosnan, M.J., Rolph, T.P., Grimsrud, P.A., and Muoio, D.M. (2016). The Acetyl Group Buffering Action of Carnitine Acetyltransferase Offsets Macronutrient-Induced Lysine Acetylation of Mitochondrial Proteins. *Cell Rep* 14, 243-254.

Davoudi, M., Kotarsky, H., Hansson, E., and Fellman, V. (2014). Complex I function and supercomplex formation are preserved in liver mitochondria despite progressive complex III deficiency. *PLoS One* 9, e86767.

Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229.

Dudkina, N.V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.P., and Boekema, E.J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1797, 664-670.

Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2008). The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr* 40, 419-424.

Fisar, Z., Hroudova, J., Hansikova, H., Spacilova, J., Lelkova, P., Wenchich, L., Jirak, R., Zverova, M., Zeman, J., Martasek, P., *et al.* (2016). Mitochondrial Respiration in the Platelets of Patients with Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 13, 930-941.

Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2, 287-295.

Garnier, A., Fortin, D., Delomenie, C., Momken, I., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551, 491-501.

Gomes, K.M., Campos, J.C., Bechara, L.R., Queliconi, B., Lima, V.M., Disatnik, M.H., Magno, P., Chen, C.H., Brum, P.C., Kowaltowski, A.J., *et al.* (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res* 103, 498-508.

Gomez, L.A., Monette, J.S., Chavez, J.D., Maier, C.S., and Hagen, T.M. (2009). Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys* 490, 30-35.

- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54, 1015-1069.
- Hoekstra, A.S., and Bayley, J.P. (2013). The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta* 1827, 543-551.
- Houser, S.R., Margulies, K.B., Murphy, A.M., Spinale, F.G., Francis, G.S., Prabhu, S.D., Rockman, H.A., Kass, D.A., Molkentin, J.D., Sussman, M.A., *et al.* (2012). Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 111, 131-150.
- Huang, L., Zhang, K., Guo, Y., Huang, F., Yang, K., Chen, L., Huang, K., Zhang, F., Long, Q., and Yang, Q. (2017). Honokiol protects against doxorubicin cardiotoxicity via improving mitochondrial function in mouse hearts. *Sci Rep* 7, 11989.
- Hutter, E., Unterluggauer, H., Garedew, A., Jansen-Durr, P., and Gnaiger, E. (2006). High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Exp Gerontol* 41, 103-109.
- Irwin, M.W., Mak, S., Mann, D.L., Qu, R., Penninger, J.M., Yan, A., Dawood, F., Wen, W.H., Shou, Z., and Liu, P. (1999). Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 99, 1492-1498.
- Jackson, C.B., Nuoffer, J.M., Hahn, D., Prokisch, H., Haberberger, B., Gautschi, M., Haberli, A., Gallati, S., and Schaller, A. (2014). Mutations in SDHD lead to autosomal recessive encephalomyopathy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* 51, 170-175.
- Julienne, C.M., Dumas, J.F., Goupille, C., Pinault, M., Berri, C., Collin, A., Tesseraud, S., Couet, C., and Servais, S. (2012). Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 3, 265-275.
- Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S., and Kurosawa, T. (2011). Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60, 481-487.
- Khechaduri, A., Bayeva, M., Chang, H.C., and Ardehali, H. (2013). Heme levels are increased in human failing hearts. *J Am Coll Cardiol* 61, 1884-1893.
- Kim, H.J., and Winge, D.R. (2013). Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1827, 627-636.
- Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Okita, K., and Tsutsui, H. (2015). Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int Heart J* 56, 475-484.
- Kinugawa, S., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Ide, T., Suematsu, N., Satoh, S., Utsumi, H., and Takeshita, A. (2000). Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling

and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87, 392-398.

Kodama, M., Tachikawa, H., Kashimura, T., Hayashi, M., Yoshida, T., Hanawa, H., Aizawa, Y., Nakazawa, M., and Watanabe, K. (2004). [Effects of humoral factors on left ventricular remodeling under chronic heart failure]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 123, 63-70.

Lark, D.S., Torres, M.J., Lin, C.T., Ryan, T.E., Anderson, E.J., and Neuffer, P.D. (2016). Direct real-time quantification of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in permeabilized skeletal muscle myofibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 311, C239-245.

Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., *et al.* (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 590, 3349-3360.

Lerner, C.A., Sundar, I.K., and Rahman, I. (2016). Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammation and COPD. *Int J Biochem Cell Biol* 81, 294-306.

Li, F., He, X., Ye, D., Lin, Y., Yu, H., Yao, C., Huang, L., Zhang, J., Wang, F., Xu, S., *et al.* (2015). NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell* 60, 661-675.

Madamanchi, N.R., and Runge, M.S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 100, 460-473.

Marin-Garcia, J., and Goldenthal, M.J. (2008). Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail Rev* 13, 137-150.

Marin-Garcia, J., Goldenthal, M.J., Damle, S., Pi, Y., and Moe, G.W. (2009). Regional distribution of mitochondrial dysfunction and apoptotic remodeling in pacing-induced heart failure. *J Card Fail* 15, 700-708.

Massie, B.M., Simonini, A., Sahgal, P., Wells, L., and Dudley, G.A. (1996). Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27, 140-145.

Meng, J., Zhang, F., Zhang, X.T., Zhang, T., Li, Y.H., Fan, L., Sun, Y., Zhang, H.L., and Mei, Q.B. (2015). Ku70 is essential for histone deacetylase inhibitor trichostatin A-induced apoptosis. *Mol Med Rep* 12, 581-586.

Mulligan, C.M., Sparagna, G.C., Le, C.H., De Mooy, A.B., Routh, M.A., Holmes, M.G., Hickson-Bick, D.L., Zarini, S., Murphy, R.C., Xu, F.Y., *et al.* (2012). Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc Res* 94, 460-468.

Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C., and Guarente, L. (2009). SIRT5 Deacetylates

carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137, 560-570.

O'Neill, L.A. (2013). Cardiolipin and the Nlrp3 inflammasome. *Cell Metab* 18, 610-612.

Okura, Y., Ramadan, M.M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K., Tanabe, N., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2008). Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J* 72, 489-491.

Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Moye, L.A., Basta, L., Brown, E.J., Jr., Cuddy, T.E., Davis, B.R., Geltman, E.M., Goldman, S., Flaker, G.C., *et al.* (1992). Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327, 669-677.

Qi, X., and Mochly-Rosen, D. (2008). The PKCdelta -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria - an essential step in subsequent apoptosis. *J Cell Sci* 121, 804-813.

Quant, P.A., Tubbs, P.K., and Brand, M.D. (1990). Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme. *Eur J Biochem* 187, 169-174.

Reimann, J., Kunz, W.S., Vielhaber, S., Kappes-Horn, K., and Schroder, R. (2003). Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29, 45-51.

Renkema, G.H., Wortmann, S.B., Smeets, R.J., Venselaar, H., Antoine, M., Visser, G., Ben-Omran, T., van den Heuvel, L.P., Timmers, H.J., Smeitink, J.A., *et al.* (2015). SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *Eur J Hum Genet* 23, 202-209.

Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.

Rosca, M.G., and Hoppel, C.L. (2009). New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *J Bioenerg Biomembr* 41, 107-112.

Rosca, M.G., and Hoppel, C.L. (2010). Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res* 88, 40-50.

Rosca, M.G., Vazquez, E.J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M.P., Stanley, W., Sabbah, H.N., and Hoppel, C.L. (2008). Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res* 80, 30-39.

Russell, A.P., Foletta, V.C., Snow, R.J., and Wadley, G.D. (2014). Skeletal muscle mitochondria: a major player in exercise, health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1840,

1276-1284.

Rutter, J., Winge, D.R., and Schiffman, J.D. (2010). Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10, 393-401.

Sadhukhan, S., Liu, X., Ryu, D., Nelson, O.D., Stupinski, J.A., Li, Z., Chen, W., Zhang, S., Weiss, R.S., Locasale, J.W., *et al.* (2016). Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4320-4325.

Sanbe, A., Tanonaka, K., Hanaoka, Y., Katoh, T., and Takeo, S. (1993). Regional energy metabolism of failing hearts following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 25, 995-1013.

Schafer, E., Dencher, N.A., Vonck, J., and Parcej, D.N. (2007). Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46, 12579-12585.

Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.

Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 276, 37861-37867.

Scheubel, R.J., Tostlebe, M., Simm, A., Rohrbach, S., Prondzinsky, R., Gellerich, F.N., Silber, R.E., and Holtz, J. (2002). Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 40, 2174-2181.

Schwall, C.T., Greenwood, V.L., and Alder, N.N. (2012). The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1817, 1588-1596.

Sharov, V.G., Goussev, A., Lesch, M., Goldstein, S., and Sabbah, H.N. (1998). Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1757-1762.

Sharov, V.G., Todor, A.V., Silverman, N., Goldstein, S., and Sabbah, H.N. (2000). Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2361-2367.

Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., and Nair, K.S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5618-5623.

Smith, S., Cottingham, I.R., and Ragan, C.I. (1980). Immunological assays of the NADH dehydrogenase content of bovine heart mitochondria and submitochondrial particles. *FEBS Lett* 110, 279-282.

- Stewart, S., MacIntyre, K., Hole, D.J., Capewell, S., and McMurray, J.J. (2001). More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 3, 315-322.
- Stride, N., Larsen, S., Hey-Mogensen, M., Sander, K., Lund, J.T., Gustafsson, F., Kober, L., and Dela, F. (2013). Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail* 15, 150-157.
- Takada, S., Masaki, Y., Kinugawa, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Takahashi, M., *et al.* (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovasc Res* 111, 338-347.
- Tsuburaya, R. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Left Ventricular Structural Remodeling After Acute Myocardial Infarction- Usefulness of Leukocyte Mitochondrial Copy Number. *Circ J* 81, 1772-1773.
- Tsuda, M., Fukushima, A., Matsumoto, J., Takada, S., Kakutani, N., Nambu, H., Yamanashi, K., Furihata, T., Yokota, T., Okita, K., *et al.* (2018). Protein acetylation in skeletal muscle mitochondria is involved in impaired fatty acid oxidation and exercise intolerance in heart failure. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*.
- Van Vranken, J.G., Na, U., Winge, D.R., and Rutter, J. (2015). Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50, 168-180.
- Vartak, R., Porras, C.A., and Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4, 582-590.
- Weinert, B.T., Scholz, C., Wagner, S.A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J.A., and Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep* 4, 842-851.
- Wittig, I., Braun, H.P., and Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418-428.
- Wittig, I., and Schagger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338-4346.
- Zeng, H.L., Zhong, Q., Qin, Y.L., Bu, Q.Q., Han, X.A., Jia, H.T., and Liu, H.W. (2011). Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol* 12, 32.
- Zhang, Y., Bharathi, S.S., Rardin, M.J., Lu, J., Maringer, K.V., Sims-Lucas, S., Prochownik, E.V., Gibson, B.W., and Goetzman, E.S. (2017). Lysine desuccinylase SIRT5 binds to cardiolipin and regulates the electron transport chain. *J Biol Chem* 292, 10239-10249.