HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	心不全における骨格筋ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾は脂肪酸酸化障害と運動耐容能低下に関わる［全文の要約］
Author(s)	津田, 正哉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2393 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13014号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70535
Type	doctoral thesis
File Information	Masaya_Tsuda_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

心不全における骨格筋ミトコンドリアタンパクの

アセチル化修飾は脂肪酸酸化障害と

運動耐容能低下に関わる

（**Protein Acetylation in Skeletal Muscle Mitochondria**

Is Involved in Impaired Fatty Acid Oxidation and

Exercise Intolerance in Heart Failure）

2018 年 **3** 月

北海道大学

津田　正哉

1　緒言

心不全患者における運動耐容能低下は，息切れなどの主要な臨床症状の原因となる基本的な病態であると同時に，強力な予後不良因子でもある．運動耐容能を規定する要因は様々であるが，心機能を含む中心循環よりも骨格筋機能を含む末梢要因が重要な役割を果たしていると考えられている．心不全における骨格筋異常には，遅筋から速筋への筋線維型の変化，筋力低下，筋萎縮等が報告されているが，当教室ではこれまで心不全患者において骨格筋エネルギー代謝障害が生じ，全身の運動耐容能を規定することを明らかにした．しかしながら，その詳細な分子機序については未解明である．近年，タンパクの主要な翻訳後修飾のひとつであるリジン残基のアセチル化修飾がミトコンドリアにおけるエネルギー代謝制御に深く関わることが報告されている．本研究は，「心不全において骨格筋ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾が亢進し，脂肪酸酸化を含むエネルギー代謝の障害に関与することで運動耐容能低下を引き起こす」と仮説を立て，臨床・基礎の両面から検証することを目的とした．まず心不全患者の血液検体を用いてアセチルリジンを含む全代謝物の網羅的解析（メタボロミクス解析）を行い，運動耐容能との関連を検討した（研究 1）．次に心筋梗塞後心不全モデルマウスを作成して，骨格筋ミトコンドリアにおけるタンパクアセチル化修飾と酵素活性，ミトコンドリア呼吸能との関連を検証し，また培養骨格筋細胞を用いて，ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾と脂肪酸 β 酸化酵素活性との直接的な関連についても検討した（研究 2）．

2　方法

（研究 1）北海道大学病院通院中の心不全患者 10 名と年齢を調整した健常対照者 5 名を対象とした．全例，呼気ガス分析とエルゴメーターを用いた心肺運動負荷試験によって運動耐容能の指標である最高酸素摂取量（peak VO_2）を測定した．さらに血液を採取してキャピラリー電気泳動-質量分析法により血中代謝物の網羅的解析（メタボロミクス解析）を行った．

（研究 2）雄性 8–10 週齢 C57BL/6J マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞作成あるいは偽手術（sham 手術）を行った．以下の実験は心不全群（HF 群，n = 11）ならびに sham 手術群（sham 群，n = 11）で行った．手術 4 週後に心臓超音波検査によって心機能を評価した．さらに小動物用トレッドミルと呼気ガス分析を用いて運動耐容能の各指標を評価した．また，採取した骨格筋組織から抗アセチルリジン抗体を用いた免疫沈降法によってアセチル化タンパクを精製後，質量分析法により網羅的に探索した．骨格筋組織を用いて高感度ミトコンドリア呼吸能解析装置により各エネルギー代謝基質におけるミトコンドリア呼吸能の測定を行い，またクエン酸合成酵素ならびに脂肪酸 β 酸化酵素のひとつである β-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ（β-

HAD）の酵素活性を分光光度計によって測定した．最後に，マウス培養骨格筋細胞を用いて，RNA 干渉法によりミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素であるサーチュイン 3（SIRT3）のノックダウンを行い，ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾と β-HAD 活性との直接的な関連について検討した．

3　結果

（研究 1）血液サンプルを用いたメタボロミクス解析では 233 種の代謝物が同定され，そのうち対照群と比較して心不全患者群で有意に増加し，かつ運動耐容能の指標である peak VO_2 と相関する代謝物として，アルギニンメチル化修飾の代謝物である非対称性ジメチルアルギニン（r = -0.74），リン脂質代謝物である N,N-dimethylglycine（r = -0.74），尿素（r = -0.74），アセチルリジン（r = -0.81）を認め，その中でアセチルリジンは peak VO_2 と最も強い負の相関を示した．

（研究 2）心筋梗塞作成ならびに sham 手術後 4 週の心臓超音波検査で，HF 群では sham 群と比較して有意に左室拡張末期径の拡大，左室内径短縮率の低下を認め，心筋梗塞，心不全が適切に作成されていることを確認した．また，トレッドミルにより評価した走行距離，仕事量，ならびに呼気ガス分析で評価した peak VO_2 はいずれも HF 群で sham 群と比較して有意に低値であった．骨格筋組織より単離したミトコンドリア分画におけるアセチル化修飾を免疫ブロット法により評価したところ，HF 群で sham 群と比較して有意にアセチル化修飾が亢進していた．このミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾亢進と並行して， SIRT3 のタンパク発現が HF 群の骨格筋組織で有意に低下していた．一方で，SIRT3 活性の必須補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD^+）量ならびに NAD^+ とその還元型である NADH との比（NAD^+/NADH）は両群で有意差を認めなかった．抗アセチルリジン抗体により精製したアセチル化タンパクを質量分析法によって解析したところ，151 種のタンパクが検出され，そのうち 50 種がミトコンドリアに存在するタンパクであった．検出されたミトコンドリアタンパクは脂肪酸 β 酸化，トリカルボン酸回路，分枝鎖アミノ酸代謝，および電子伝達系に関連する酵素を含み，その中でも脂肪酸 β 酸化酵素は HF 群で顕著にアセチル化修飾を受けており，β-HAD 活性の低下と関連し，脂肪酸基質存在下でのミトコンドリア呼吸能低下とも一致した．培養骨格筋細胞を用いた実験では SIRT3 のノックダウンによりそのタンパク発現は約 70%の低下を認め，単離したミトコンドリア分画におけるアセチル化修飾は亢進し，これに伴い β-HAD 活性は有意に低下した．

4　考察

心不全患者におけるヒト血液サンプルのメタボロミクス解析により運動耐容能と負の相関を認める代謝物としてアセチルリジンを同定した．アセチルリジンはアセチル化修飾を受けたタンパクのリジン残基に由来していることから，心不全においてアセチル化修飾が全身レベルで増加していることを反映している可能性が示唆された．

また運動耐容能低下を呈する心筋梗塞後心不全モデルマウスの骨格筋組織においてもアセチル化修飾が亢進していることを示した．骨格筋におけるタンパクアセチル化修飾の多くはミトコンドリアで生じており，これにはミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素である SIRT3 の発現低下が関与している可能性が示唆された．アセチル化タンパクの網羅的解析により，ミトコンドリアエネルギー代謝関連酵素がアセチル化修飾を受けており，特に脂肪酸β酸化酵素はその多くがアセチル化修飾を受け，酵素活性の低下や脂肪酸基質存在下でのミトコンドリア呼吸能の低下と関連した．SIRT3 をノックダウンした培養骨格筋細胞ではミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾が亢進し，脂肪酸β酸化酵素の酵素活性も低下していることを示した．これらの知見は心不全において骨格筋 SIRT3 の発現低下，骨格筋ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾の亢進が脂肪酸β酸化を減弱させ，ミトコンドリア機能低下から運動耐容能低下をきたすことを示唆する．

5　結論

本研究では心不全患者において血漿アセチルリジンが上昇しており，運動耐容能の指標である peak VO_2 と負の相関を示した．また，運動耐容能低下を呈する心筋梗塞後心不全モデルマウスの骨格筋において，ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾亢進とミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素である SIRT3 の発現低下を認め，併せて脂肪酸β酸化酵素の酵素活性低下ならびに脂肪酸基質存在下でのミトコンドリア呼吸能低下を認めた．

今後は SIRT3 を治療標的として骨格筋ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾へ介入することで骨格筋エネルギー代謝の改善，運動耐容能改善を目指した新規治療法の開発が期待される．