



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
Author(s)	津田, 正哉
Description	配架番号 : 2393
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13014号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13014
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75139
Type	doctoral thesis
File Information	Masaya_Tsuda.pdf



学位論文

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

学位論文

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

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1 緒言	3
2 略語表	7
3 実験方法	10
3.1 実験 1 心不全患者における血漿アセチルリジンと運動耐容能の関連に についての検討	10
3.1.1 実験デザイン	10
3.1.2 心臓超音波検査	10
3.1.3 心肺運動負荷試験	10
3.1.4 血中メタボロミクス解析	10
3.2 実験 2 心筋梗塞後心不全モデルマウス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についての検討	12
3.2.1 実験デザイン	12
3.2.2 心筋梗塞手術	13
3.2.3 心臓超音波検査	14
3.2.4 運動耐容能テスト	14
3.2.5 骨格筋組織からのミトコンドリア分画単離	15
3.2.6 免疫ブロット法	16
3.2.7 骨格筋における NAD ⁺ 代謝物の測定	19
3.2.8 免疫沈降 - 質量分析法	20
3.2.9 骨格筋における CS 活性の測定	21
3.2.10 骨格筋における β -HAD 活性の測定	21
3.2.11 骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能の測定	22
3.3 実験 3 培養骨格筋細胞における SIRT3 がミトコンドリアタンパクのア セチル化修飾に及ぼす影響の検討	24
3.3.1 細胞種と培養条件	24
3.3.2 実験デザイン	24

3.3.3	培養骨格筋細胞に対する RNA 干渉法を用いた SIRT3 ノックダウン	24
3.3.4	培養骨格筋細胞からのミトコンドリア分画単離	25
3.3.5	SIRT3 KD 培養骨格筋細胞を用いた免疫ブロット法	26
3.3.6	SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における β -HAD 活性の測定	26
3.4	統計学的解析	26
4	実験結果	27
4.1	実験 1 心不全患者における血漿アセチルリジンと運動耐容能の関連についての検討	27
4.1.1	患者背景	27
4.1.2	心不全患者における血中メタボロミクス解析	29
4.2	実験 2 心筋梗塞後心不全モデルマウス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についての検討	30
4.2.1	心臓超音波検査, 組織重量計測	30
4.2.2	運動耐容能評価	32
4.2.3	骨格筋におけるタンパクアセチル化修飾	33
4.2.4	骨格筋における SIRT3 のタンパク発現と NAD^+ 代謝物	34
4.2.5	骨格筋における免疫沈降 - 質量分析法を用いたアセチル化タンパクの網羅的解析	35
4.2.6	骨格筋ミトコンドリアアセチル化タンパクに対する遺伝子オンロジー解析	36
4.2.7	骨格筋におけるミトコンドリア生合成およびミトコンドリア量に関連するタンパク発現と CS 活性	37
4.2.8	骨格筋における脂肪酸代謝に関連するタンパク発現	38
4.2.9	骨格筋における β -HAD 活性	39
4.2.10	骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能	40
4.3	実験 3 培養骨格筋細胞における SIRT3 がミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾に及ぼす影響の検討	41
4.3.1	SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における SIRT3 のタンパク発現	41
4.3.2	SIRT3 KD 培養骨格筋細胞におけるタンパクアセチル化修飾	42

4.3.3	SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における β -HAD 活性.....	43
5	考察	44
6	総括および結論	47
	謝辞	48
	引用文献	49

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.

Masaya Tsuda, Arata Fukushima, Junichi Matsumoto, Shingo Takada, Naoya Kakutani, Takaaki Furihata, Takashi Yokota, Koichi Okita, Shintaro Kinugawa, Toshihisa Anzai
Protein Acetylation in Skeletal Muscle Mitochondria Is Involved in Impaired Fatty Acid Oxidation and Exercise Intolerance in Heart Failure
Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

本研究の一部は以下の学会に発表した.

- 1 **Masaya Tsuda**, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Wataru Mizushima, Takaaki Furihata, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Takayuki Nakajima, Satoshi Maekawa, Hideo Nambu, Ryosuke Shirakawa, Naoya Kakutani, Koichi Okita, Hiroyuki Tsutsui
Mitochondrial Protein Acetylation in Skeletal Muscle Was Associated With Exercise Intolerance in Heart Failure After Myocardial Infarction in Mice.
89th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 14, 2016, New Orleans, LA, USA
- 2 **Masaya Tsuda**, Shingo Takada, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Wataru Mizushima, Takaaki Furihata, Junichi Matsumoto, Takashi Katayama, Takayuki Nakajima, Satoshi Maekawa, Hideo Nambu, Ryosuke Shirakawa, Naoya Kakutani, Shintaro Kinugawa
Skeletal Muscle Mitochondrial Protein Hyperacetylation Contributes to Exercise Intolerance in a Murine Model of Heart Failure After Myocardial Infarction
第 81 回日本循環器学会学術総会 2017 年 3 月 17 日, 金沢
- 3 **Masaya Tsuda**, Arata Fukushima, Junichi Matsumoto, Shingo Takada, Takaaki Furihata, Takayuki Nakajima, Takashi Katayama, Naoya Kakutani, Takashi Yokota, Shintaro, Kinugawa
Mitochondrial Protein Hyperacetylation in Skeletal Muscle is Associated with Exercise Tolerance in Murine Model of Post-Infarct Heart Failure
International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions 2017 22nd World Congress on Heart Disease, July 14-16, 2017, Vancouver, BC, Canada

- 4 **Masaya Tsuda**, Arata Fukushima, Junichi Matsumoto, Shingo Takada, Takaaki Furihata, Takashi Yokota, Takashi Katayama, Takayuki Nakajima, Satoshi Maekawa, Hideo Nambu, Ryosuke Shirakawa, Naoya Kakutani, Yoshikuni Obata, Katsuma Yamanashi, Koichi Okita, Shintaro Kinugawa
Acetylation of Mitochondrial Proteins Alters Fatty Acid β -Oxidation in Skeletal Muscle and Limits Exercise Capacity in Post-Infarct Heart Failure in Mice
90th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 14, 2017, Anaheim, CA, USA

1 緒言

心不全患者では運動能力（以下、運動耐容能）が低下している。このことは日常生活を大きく制限し、生活の質を低下させる要因となる。さらに、運動耐容能低下は心不全の予後とも密接に関わっていることが知られており（図 1-1）¹、重症度を示す最も重要な基本病態のひとつである。これまでの研究では心不全患者の運動耐容能低下は左室収縮能障害の程度と相関しないことが報告されている²。さらに、強心薬であるドブタミン投与によって一時的に心拍出量や下肢血流量を増加させても運動耐容能の改善は認められなかった³。また、運動耐容能が低下した心不全患者において自転車エルゴメーターによる下肢の運動に上肢の運動を付け加えると運動耐容能の指標である最高酸素摂取量（peak VO₂）がさらに増加することが報告されているが⁴、全身の運動トレーニングでは有意な心拍出量の増加は得られない⁵。従って、これらの知見は心機能や心拍出量の低下では心不全患者の運動耐容能低下を説明することはできず、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ことを示唆する⁶。

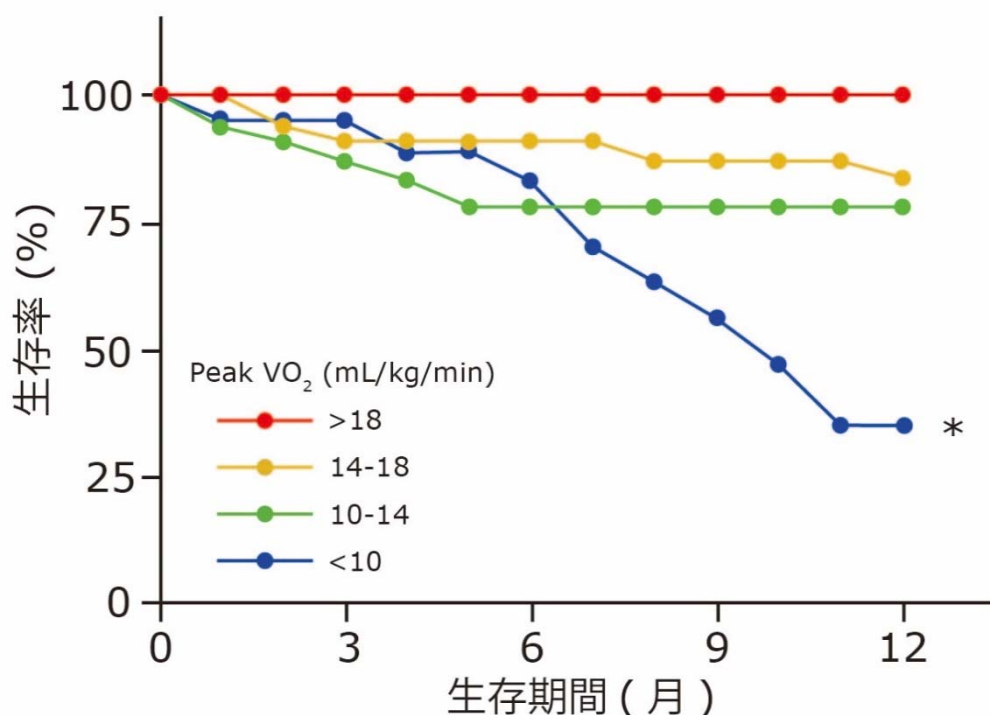


図 1-1 心不全患者における運動耐容能低下と予後の関係。文献 1 より引用改変。

* $p < 0.05$; peak VO₂ <10 vs. >14 mL/kg/min.

心不全における骨格筋異常には①遅筋（Ⅰ型筋線維）から速筋（Ⅱ型筋線維）への筋線維型の変化⁷，②筋力低下，③骨格筋萎縮⁸，そして④骨格筋エネルギー代謝障害が含まれる⁹。心不全患者の骨格筋エネルギー代謝障害を明らかにするために，当教室では磁気共鳴スペクトロスコピー（magnetic resonance spectroscopy, MRS）を用いて運動中の骨格筋におけるエネルギー代謝を解析した。心不全患者では同一負荷量における骨格筋のクレアチンリン酸（phosphocreatine, PCr）の枯渇と pH の低下が健常群と比較して顕著であり，PCr の損失率は peak VO₂ と関連していた⁹。他の多くの研究者も同様の結果を報告しており¹⁰，骨格筋のエネルギー代謝障害が全身の運動耐容能を規定することを示している。さらに当教室では拡張型心筋症による心不全患者を対象に MRS による筋細胞内脂肪（intramyocellular lipid, IMCL）の測定を行った。心不全患者では有意に IMCL が増加していた（図 1-2B）¹¹。IMCL の増加は骨格筋ミトコンドリアでの脂肪酸酸化障害の存在を示唆している。しかしながら，心不全においてどのような機序で骨格筋エネルギー代謝障害，特にミトコンドリアの脂肪酸酸化障害が起こるかに関してはこれまで明らかにされていない。

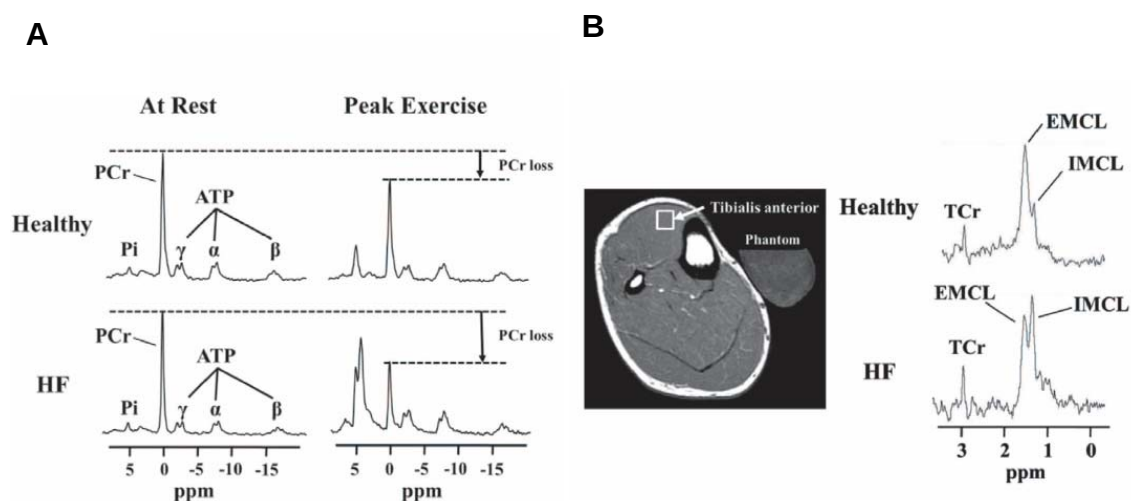


図 1-2 健常者および心不全患者における座位自転車エルゴメーターによる安静時と最大負荷時の ³¹P-MRS の代表的な図 (A)。文献 9 より引用改変。健常者および心不全患者の IMCL 評価を目的とした ¹H-MRS の代表的な図 (B)。文献 11 より引用改変。

アセチル化はリン酸化やユビキチン化と並ぶタンパクの主要な翻訳後修飾のひとつであり、修飾によりタンパクの多機能性を高めている。典型的なアセチル化修飾部位として、ヒストン蛋白のN末端を構成する塩基性アミノ酸のリジン残基が同定されている。ヒストン蛋白は正電荷を帯びる塩基性アミノ酸を含むことで負電荷を有するDNAと強固に結合しているが、リジン残基のアセチル化修飾によってアミノ酸の正電荷が中和されDNAとヒストン間の相互作用が緩み遺伝子の転写活性が変化する¹²。しかし、最近ヒストン蛋白だけでなくミトコンドリアに局在する代謝関連タンパクもまたアセチル化修飾を受けることが見出され、エネルギー代謝の新たな制御機構として注目されている¹³。実際にアセチル化修飾の標的は脂肪酸 β 酸化、解糖系、トリカルボン酸 (tricarboxylic acid, TCA) 回路や電子伝達系などほとんど全てのエネルギー代謝経路に関連するタンパクを含む¹⁴。アセチル化修飾によって電気的に中和されたタンパクはその局在や相互結合、さらには立体構造を変化させることで代謝酵素活性を抑制もしくは活性化させる。これまで病態におけるアセチル化修飾の果たす影響について、Hirscheyらは食餌誘発性糖尿病マウスにおいて肝ミトコンドリアでタンパクアセチル化修飾が亢進し、脂肪酸 β 酸化酵素を不活化することで脂肪肝を惹起することを報告した¹⁵。さらにHortonらは圧負荷心不全モデルマウスの心筋組織や拡張型心筋症患者の心筋検体でミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾が亢進することを報告した¹⁶。しかしながら、心不全においてはアセチル化修飾とエネルギー代謝酵素との関連は十分に検討されておらず、さらには心不全の骨格筋エネルギー代謝障害におけるアセチル修飾の役割に関する研究は皆無である。

一方、アセチル化修飾はアセチル基転移酵素とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依存性脱アセチル化酵素 (サーチュイン, SIRT) によって可逆的に調節される (図 1-3)。ヒトサーチュインは7種類のサブタイプ (SIRT1-7) が存在し、それぞれが特徴的な細胞内局在を示すが、このうちSIRT3はミトコンドリアに局在する主要な脱アセチル化酵素であり、エネルギー代謝に重要な役割を担っている¹⁷。SIRT3は不全心筋、あるいは糖尿病マウスの心筋および骨格筋においてそのタンパク発現が低下し、過剰なアセチル化修飾を誘導することが報告されているが^{18,19}、心不全における骨格筋でのSIRT3の発現は不明のままである。

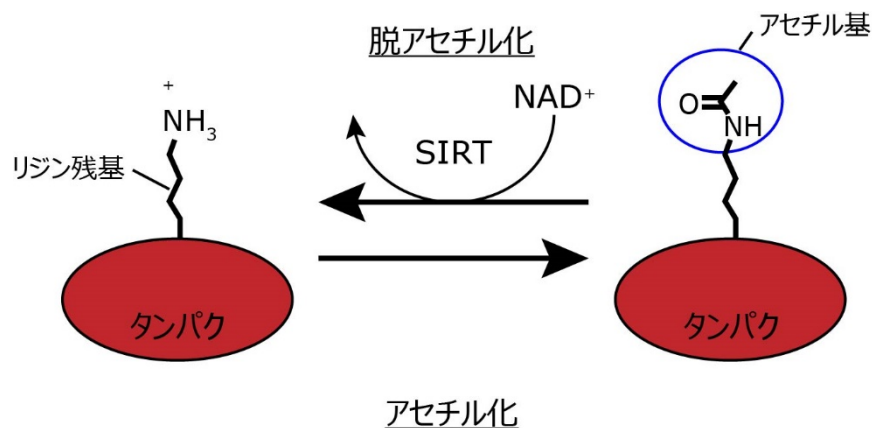


図 1-3 タンパクリジン残基のアセチル化修飾と SIRT による脱アセチル化.

以上より、本研究で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の仮説を立てた。アセチル化修飾の役割を基礎と臨床の双方から明らかにするために、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。次に運動耐容能低下をきたした心筋梗塞（myocardial infarction, MI）後心不全モデルマウスを作製し、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た。最後に、培養骨格筋細胞を用いて RNA 干渉法により SIRT3 をノックダウンし、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検討した。

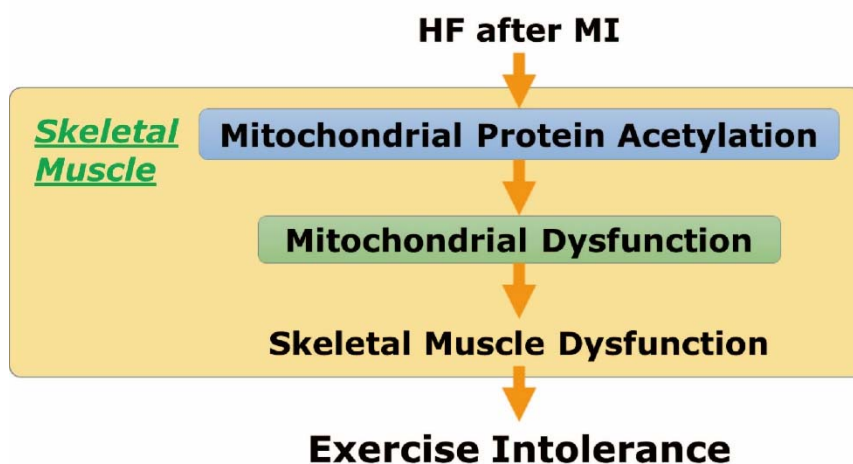


図 1-4 本研究の仮説.

2 本研究で使用する略語と記号

ACAA2: Ketoacyl-CoA thiolase; ケトアシル CoA チオラーゼ
ACADL: Acyl-CoA dehydrogenase, long-chain; 長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ
ACE: Angiotensin converting enzyme; アンジオテンシン変換酵素
ADMA: Asymmetric dimethylarginine; 非対称性ジメチルアルギニン
ADP: Adenosine 5'-diphosphate; アデノシン二リン酸
AT: Anaerobic threshold; 嫌気代謝閾値
ATP: Adenosine 5'-triphosphate; アデノシン三リン酸
AW: Anterior wall; 前壁
BCA: Bicinchoninic acid; ビシンコニン酸
BSA: Bovine serum albumin; ウシ血清アルブミン
BW: Body weight; 体重
CI: Mitochondrial respiratory chain complex 1; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I
CII: Mitochondrial respiratory chain complex 2; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II
CIII: Mitochondrial respiratory chain complex 3; ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 III
CBB: Coomassie brilliant blue; クマシーブリリアントブルー
COXIV: Cytochrome c oxidase IV; シトクロム c オキシダーゼ複合体 IV
CPT1B: Carnitine palmitoyltransferase 1B; カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1B
CPT2: Carnitine palmitoyltransferase 2; カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2
Cr: Creatine; クレアチン
CS: Citrate synthase; クエン酸合成酵素
dd H₂O: Deionized-distilled hydrogen oxide; 脱イオン水
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; ダルベッコ改変イーグル培地
DTNB: 5', 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) ; 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)
DTT: Dithiothreitol; ジチオトレイトール
ECHS1: Enoyl-CoA hydratase; エノイル CoA ヒドラターゼ
EDD: End-diastolic diameter ; 拡張末期径
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; エチレンジアミン四酢酸
EGTA: Ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N',N'-tetraacetic acid; グリコールエーテルジアミン四酢酸
EHHADH: Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; エノイル CoA ヒドラターゼ/3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ
FAO: Fatty acid oxidation; 脂肪酸酸化

FBS: Fetal bovine serum; ウシ胎児血清
 GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ
 H₂O: Hydrogen oxide; 水
 HADHA: Trifunctional enzyme subunit α ; 三頭酵素サブユニット α
 HCl: Hydrochloride; 塩酸
 HF: Heart failure; 心不全
 HRP: Horseradish peroxidase; 西洋ワサビペルオキシダーゼ
 LDS: Lithium dodecyl sulfate; ドデシル硫酸リチウム
 LEAK: Proton leak; プロトンリーク
 LV: Left ventricle; 左室
 MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; 2-モルホリノエタンスルホン酸
 MgCl₂: Magnesium chloride; 塩化マグネシウム
 MI: Myocardial infarction; 心筋梗塞
 MiR05: Mitochondrial respiration medium; ミトコンドリア呼吸能測定用緩衝液
 MRS: Magnetic resonance spectroscopy; 磁気共鳴スペクトロスコピー
 MT: Migration time; 移動時間
 MTCO1: Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase 1; シトクロム c オキシダーゼサブユニット 1
 NaCl: Sodium chloride; 塩化ナトリウム
 NAD⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); ニコチナミドアデニンジヌクレオチド (酸化型)
 NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form); ニコチナミドアデニンジヌクレオチド (還元型)
 OXPHOS: Oxidative phosphorylation; 酸化のリン酸化
 PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis; ポリアクリルアミドゲル電気泳動
 PBS: Phosphate buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水
 PCr: Phosphocreatine; クレアチンリン酸
 PDVF: Polyvinylidene difluoride; ポリフッ化ビニリデン
 PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ; ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子 1 α
 Pi: Inorganic phosphate; 無機リン酸
 PW: Posterior wall; 後壁
 SDMA: Symmetric dimethylarginine; 対称性ジメチルアルギニン
 SDS: Sodium dodecyl sulfate; ドデシル硫酸ナトリウム

siRNA: Small interfering RNA; 小干渉 RNA

SIRT: Sirtuin; サーチュイン

TBS: Tris buffered saline; トリス緩衝生理食塩水

TCA: Tricarboxylic acid; トリカルボン酸

TCr: Total creatine; 全クレアチン

VCO₂: Carbon dioxide production; 二酸化炭素産生量

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

VE: Minute ventilation; 分時換気量

VO₂: Oxygen uptake; 酸素摂取量

3 実験方法

3.1 実験1 心不全患者における血漿アセチルリジンと運動耐容能の関連についての検討

ヒトを対象とした研究はヘルシンキ宣言に基づき北海道大学病院 IRB で承認されたプロトコールに従って行い、全例インフォームドコンセントを取得した。

3.1.1 実験デザイン

北海道大学病院通院中の心不全患者 10 名，対照者群として年齢をマッチさせた基礎心疾患を有しない健常者 5 名を対象とした．心不全の診断はフラミンガム基準に従い，全例で心肺運動負荷試験および心臓超音波検査を行った．心肺運動負荷試験の後 3 か月以内に血液採取を行い，使用するまで -80°C で凍結保存した．

3.1.2 心臓超音波検査

経胸壁心臓超音波検査を行い，心尖部より観察して得られた四腔及び二腔走査にて修正シン普森法を用いて左室駆出率を算出した．

3.1.3 心肺運動負荷試験

座位自転車エルゴメーター（Aerobike 75XLII; Combi Wellness, Tokyo, Japan）を用いて，3 分間のウォームアップの後に心不全患者では毎分 10–15 W，健常対照者では毎分 25 W で症候限界まで漸増負荷を加えた．被験者は下肢疲労と呼吸困難のいずれかもしくは両方により運動を中止した．酸素摂取量（oxygen uptake, VO_2 ）は安静時から運動中を通して呼気ガス分析器（280E Aeromonitor AE-300S; Minato Medical Science, Osaka, Japan）を用いて測定した．Peak VO_2 は運動中に得られた最大の VO_2 と定義し，嫌気代謝閾値（anaerobic threshold, AT）は V スロープ法により求めた．分時換気量（minute ventilation, VE）と二酸化炭素産生量（carbon dioxide production, VCO_2 ）を用いて最小二乗直線回帰により VE/VCO_2 スロープを求め，評価した．

3.1.4 血中メタボロミクス解析

3.1.1 で採取した血液サンプルを用いて，以下の手順でメタボロミクス解析を行った．

- 1) 50 μL の血漿に内部標準物質を含む 450 μL のメタノールを加えて混和した後に 500 μL のクロロホルムを加えた．

- 2) 4°Cで 2,300 g, 5 分間遠心を行った後に得られた上清を 5 kDa カットオフ遠心式ろ過フィルターユニット (Ultrafree-MC- PLHCC-HMT; Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて 4°Cで 9,100 g, 2 時間遠心した.
- 3) ろ過液を乾固させた後に蒸留水を 25 μ L 加えて再溶解させた.
- 4) Agilent CE キャピラリー電気泳動システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて代謝物の解析を行った. システムの制御とデータの収集には Agilent G2201AA ChemStation software version B.03.01 for CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いた.
- 5) 得られたデータは自動積分ソフトウェアである MasterHands (Keio University, Tsuruoka, Japan) で自動抽出し, ピーク情報として質量電荷比 (m/z), 移動時間 (migration time, MT) とピーク面積値を得た. 検出されたピークに対して m/z と MT の値をもとに HMT 代謝物質ライブラリ (Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan) に登録された全物質との照合, 検索を行った. また, 得られたピーク面積値を用いて相対面積値に変換した.

3.2 実験2 心筋梗塞後心不全モデルマウス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についての検討

全ての動物実験ならびに実験に用いたマウスの飼育保管および実験計画は北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会にて承認され、「北海道大学動物実験に関する規程」に従って実施した。

3.2.1 実験デザイン

雄 10–12 週齢 C57BL/6J マウス（体重 23–26g）に対して後述するように左冠動脈を結紮して MI を作成した。また、対照として冠動脈を結紮しない偽手術（Sham 手術）マウスを作成した。これらのマウスを手術後 4 週間飼育し、トレッドミルおよび呼気ガス分析による運動耐容能テスト、心臓超音波検査を行った。運動耐容能テストから 2 日以上あけて臓器採取を実施した。臓器採取の際はトリブromoエタノール 250 mg/kg 体重を腹腔内注射して十分な麻酔深度を得た後に、確実に安楽死させ、肺、心臓ならびに骨格筋を迅速に摘出した。湿重量を測定し、免疫ブロット法、免疫沈降 - 質量分析法、酵素活性測定（以上の実験に用いる組織は液体窒素により瞬間凍結、-80°C で保存した）ならびにミトコンドリア呼吸能の測定（骨格筋新鮮組織を用いた）を行った（図 3-1）。

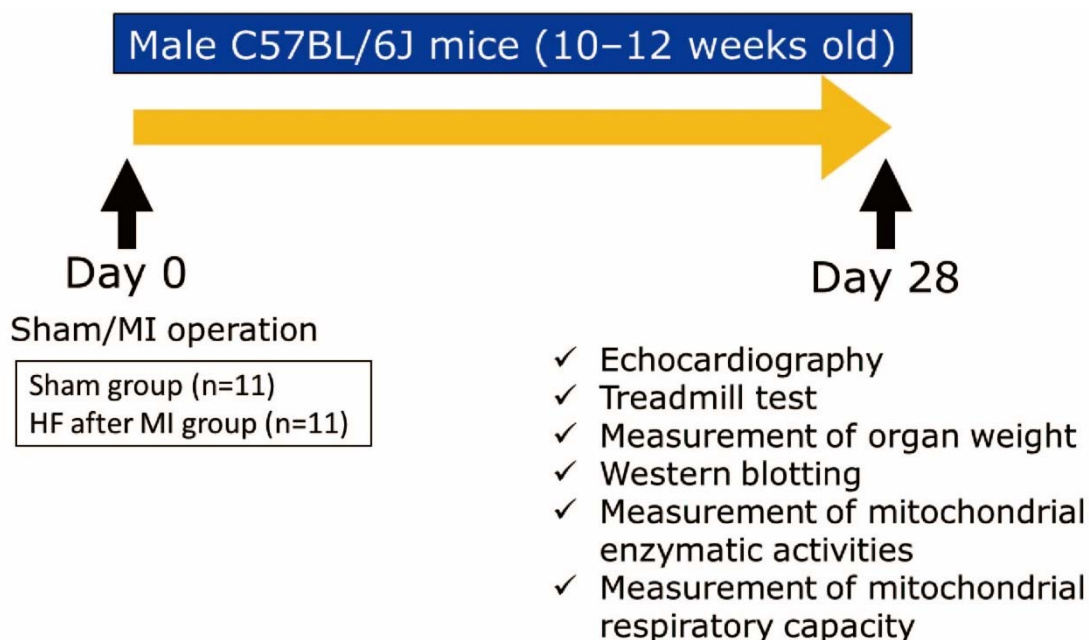


図 3-1 実験2のプロトコール.

3.2.2 心筋梗塞手術

術前処置

術前にマウスの体重を測定し、塩酸メデトミジン 0.3 mg/kg 体重，ミダゾラム 4.0 mg/kg 体重，酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg 体重の 3 種混合麻酔薬を腹腔内注射し，十分な麻酔深度となったことを確認した．手術台に背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 4-0 シルク縫合糸（Sof silk™; Coviden, Dublin, Ireland）で牽引し，頸部を伸展位で固定した．頸部正中に皮膚切開を加えた後に顎下腺と気管前筋を側方へ展開し，気管前面を露出させて確認した．舌圧子で舌根を愛護的に牽引し，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（SN-480-7x2T; Shinano, Tokyo, Japan）に接続し，毎分 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目視で確認した．

手術方法

70%アルコールで皮膚消毒を行い，実体顕微鏡（Olympus SZ61; Olympus, Tokyo, Japan）下で手術を行った．左前胸部へ皮膚切開を加え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て開胸とし，開胸器を用いて視野を展開して心臓を確認した．心臓を反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 程度遠位部で冠動脈を 8-0 シルク縫合糸（ELP M6-80B2; Akiyama Seisakusho, Tokyo, Japan）を使用して器械結紮法で結紮した．MI が適切に作成されていることを結紮後に結紮部遠位の心筋の色調が赤色から白色へ変化することで確認した（図 3-2）．Sham 手術は上記一連の手技から左冠動脈の結紮を除いた処置を行った．



図 3-2 心筋梗塞手術の代表的写真．

術後処置

術後は 37°C の保温パッドで保温を継続しながら，麻酔から十分に覚醒し，自発呼吸が安定して再開したことを確認できるまで待機した．抜管までの時間は 4 時間とし，手術時間は 10–15 分，開胸時間は 5 分前後であった．

3.2.3 心臓超音波検査

手術後 4 週間飼育した HF 群ならびに Sham 群のマウスに対して超音波診断装置 (Aplio300; Toshiba Medical System, Otawara, Japan) および 12 MHz リニアプローブを用いて心臓超音波検査を短時間作用型で心抑制の少ない麻酔下 (2.5% アバーチン 8 μ L/g, 腹腔内投与) にて行った．心臓超音波検査は 2D 傍胸骨短軸像の乳頭筋レベルで観察し，最良な像が描出されるレベルで M モード法へ切り替え，記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上，心拍数，左室内径，壁厚，左室内径短縮率を計測した．

3.2.4 運動耐容能テスト

運動耐容能は小動物用トレッドミル (Oxymax 2; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) を用いた漸増負荷運動での持久能力とミキシングチャンバー法を用いた呼気ガス分析により評価した (図 2-1)．まずトレッドミル上にマウスを置いて，トレッドミル傾斜角度を 0 度として 10 分間の安静に引き続き速度 6 m/分でウォームアップを開始した．10 分後にトレッドミル傾斜角度 10 度として 2 分毎に 2 m/分ずつ速度を漸増させた．漸増運動負荷中にマウスが途中で休まないようにトレッドミル後方に位置する電気刺激板で電気刺激を与えた．その際最大の電気刺激を与えても 10 秒以上電気刺激板から動かなくなった時点をマウスが「疲労困憊」に至ったと定義して測定を終了した．呼気ガス分析ではトレッドミル装置が置かれた密閉容器を定流量 (1 L/分) の空気で灌流し，容器へ流入する空気ならびに容器から流出する空気は除湿剤を通してガス分析装置へ導かれ，酸素濃度および二酸化炭素濃度を 10 秒毎に測定して分析を行った．持久能力の指標として走行時間と速度の積から走行距離を算出した．またマウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量 (= 体重 $\times$ 重力加速度 $\times$ 垂直方向の走行距離) を算出した．呼気ガス分析の指標として VO_2 と VCO_2 を算出し， VCO_2 と VO_2 の比から呼吸交換比を求めた．

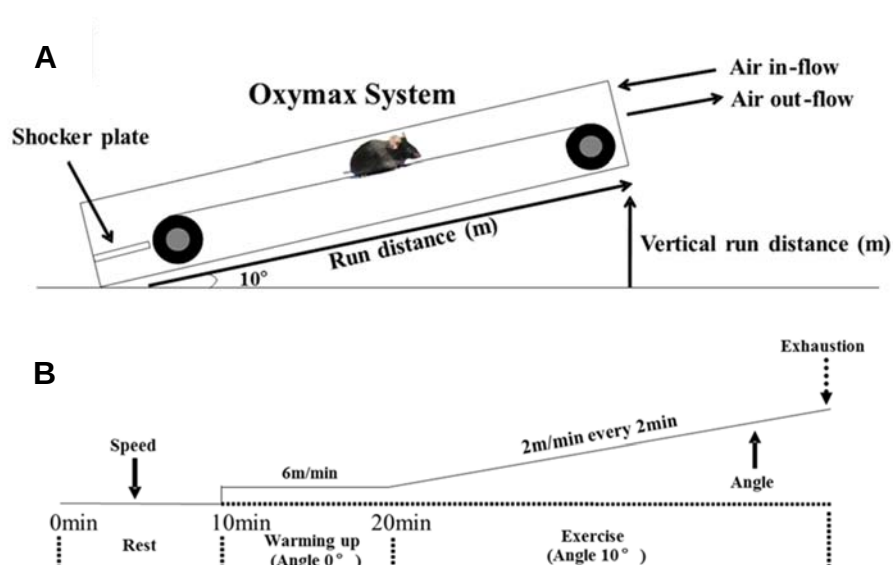


図 3-3 呼気ガス分析を併用した小動物用トレッドミル (A) と運動プロトコール (B).

3.2.5 骨格筋組織からのミトコンドリア分画単離

ミトコンドリア分画単離キット (Mitochondria Isolation Kit for Tissue; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて以下の手順でミトコンドリア分画を得た. 作業は可能な限り氷上で行った.

1) 試薬の調整

本実験における名称	溶液	添加	タンパク分解酵素阻害薬 ^{*3}
PBS	PBS	(-)	(-)
PBS/Trypsin	PBS	Trypsin ^{*2} 0.3 mg/mL	(-)
PBS/BSA	PBS	BSA ^{*1} 4 mg/mL	(-)
Reagent A/BSA	Reagent A ^{*1}	BSA ^{*1} 4 mg/mL	(+)
Reagent C	Reagent C ^{*1}	(-)	(+)
Wash buffer	Reagent C ^{*1}	ddH ₂ O 等量	(-)

^{*1} キット内に付属する試薬

Mitochondria Isolation Reagent A

Mitochondria Isolation Reagent B

Mitochondria Isolation Reagent C

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)

*² TPCK Trypsin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

*³ Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

- 2) 骨格筋凍結組織 (100 mg) を氷上の 2.0 mL チューブに入れ、チューブ内でハサミを用いて細かく切断した後に PBS/Trypsin を加えて、3 分間静置した。
- 3) PBS/Trypsin を可能な限り取り除き、PBS/BSA を 800 μ L 加えて、トリプシン作用を停止させた。
- 4) 4°C で 1,000 g, 3 分間遠心を行い、上清を破棄した。
- 5) Reagent A/BSA を 800 μ L 加えてペレットを溶解させた。
- 6) 中速度で 5 秒間ボルテックスした後、正確に 2 分間氷上で静置した。
- 7) Reagent B を 10 μ L 加え、最高速度で 5 秒間ボルテックスした後に 5 分間氷上で静置した。その際 1 分毎に 5 秒間ボルテックスした。
- 8) Reagent C を 800 μ L 加えてチューブを転倒混和し、4°C で 700 g, 10 分間遠心した。
- 9) 上清 (ミトコンドリア分画と細胞質分画を含む) を新たな 2 mL チューブへ移し、ペレット (未破碎細胞と核分画を含む) は破棄した。上清を移した 2 mL チューブを 4°C で 3,000 g, 10 分間遠心した。
- 10) 上清 (細胞質分画) を別の 2 mL チューブへ移し、ペレット (ミトコンドリア分画) に Wash buffer を 500 μ L 加えて 4°C で 12,000 g, 10 分間遠心した (ペレット表面の洗浄)。
- 11) 上清を破棄し、得られたミトコンドリア分画は免疫ブロット法などに使用するまで -80°C で凍結保存した。

3.2.6 免疫ブロット法

3.2.1 の方法でマウスより摘出し、凍結保存していた骨格筋組織を用いてタンパク抽出、電気泳動および免疫ブロットを以下の手順で行った。

タンパク抽出

- 1) 凍結保存した組織を氷上で解凍した。
- 2) 細胞溶解バッファー^{*4}に必要な量の組織を入れ、ポリトロンホモジナイザー (Ultra Turrax[®] T25 basic homogenizer; IKA Works, Staufen, Germany) でホモジナイズした。
- 3) 4°C で 15,000 g, 10 分間遠心し、上清を新しいチューブに移し、ペレットは破棄した。長期保存する場合は -80°C で凍結保存した。

*4 細胞溶解バッファの組成：50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton-X, 1 μ M トリコスタチン A, 5 mM ニコチンアミド, 10 mM 酪酸ナトリウム, タンパク分解酵素阻害薬 (Thermo Scientific™ Protease Inhibitor Cocktails; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

タンパク濃度測定

ビシンコニン酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法を用いて, 以下の手順で測定を行った.

- 1) 96 穴マイクロプレート (GREINER 96-Well CELLSTAR® Cell Culture Plates sterile, F-bottom; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) を用意した.
- 2) BCA™ タンパクアッセイキット (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) の Reagent A と Reagent B を 50 : 1 の割合で混合した.
- 3) 2)の混合液を各ウェルに 200 μ L ずつ分注した. 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 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) を 1, 2, 4, 6, 8, 16, 24 μ L ずつウェルに注入し, 次のウェルから 2 μ L ずつ測定するサンプルを注入した.
- 4) 37°Cで 30 分間保温した.
- 5) マイクロプレートリーダー (Multiskan™ GO spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 540 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濃度を算出した. 上記のタンパク濃度測定は, 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注入し, 2 つの平均値を用いた.

サンプルの調整

- 1) 4×ドデシル硫酸リチウム (lithium dodecyl sulfate, LDS) サンプルバッファ (NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X); Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と 200 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) を加えてボルテックスミキサーで攪拌した.
- 2) ヒートブロック (MULTI HEATER TYPE MH-36; WAKAMORI, Tokyo, Japan) にてサンプルを 70°Cで 5 分間加温した.
- 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, ボルテックスした.

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

- 1) AnyKD ミニプロテイン TGX ゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) よりシリコンチューブとコームを外し、電気泳動槽 (Criterion セル; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にセットした。
- 2) 電気泳動槽に SDS-PAGE 泳動用バッファー*⁵ を注入した。
- 3) サンプルを各ウェルに 5–10 μ L (10–20 μ g) 注入し、必要に応じて分子量マーカである SDS-PAGE 用マーカ (Cruz Marker Molecular Weight Standards; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), カラーマーカ (Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を注入した。
- 4) 電源装置 (POWER PAC 300; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に接続して 40 mA/ゲル (定電流) で 60 分間泳動した。
- 5) サンプルがゲルの先端まで移動したのを確認して泳動を終了とした。

*⁵ SDS-PAGE 泳動用バッファーの組成 : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

Coomassie brilliant blue (CBB) 染色

泳動後のゲルを蒸留水で 3 回, 各 5 分間洗浄した後に CBB 溶液 (Bio-Safe CBB G-250 ステイン; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に浸し, 室温で 1 時間振盪した。その後蒸留水で数回洗浄し, 背景と比較してバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた。

免疫ブロット

- 1) ゲルをポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜である Trans-Blot TurboTM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) の上に乗せた。
- 2) Trans-Blot TurboTM Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い, 2.5 A, 25 V の条件で 7 分間ゲルからメンブレンへのタンパクの転写を行った。
- 3) 電源を切り, メンブレンを外した。
- 4) メンブレンを 0.1% Tween-Tris buffered saline (TBS) で振盪した。
- 5) ブロッキング溶液として 5% スキムミルクを用いて室温で 1 時間ブロッキング処理をした。
- 6) 0.1% Tween-TBS にて振盪 (10 分間×3 回) した。
- 7) 一次抗体を使用する抗体に応じて 5% スキムミルクもしくは 5% BSA で希釈し, 4°C で一晩反応させた。
- 8) 0.1% Tween-TBS にて振盪 (10 分間×3 回) した。
- 9) 二次抗体 (5% スキムミルクで希釈) を室温で 1 時間反応させた。

10) 0.1% Tween-TBS にて振盪（10 分間×3 回）した。

検出

ECL Western Blotting Analysis System（Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK）を用い化学発光法で標識した後，ChemiDoc XRS system（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）で検出し可視化したバンドを画像解析ソフト Image J（U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を用いて集積光濃度を定量して解析した。内在性コントロールとして抗グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ

（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）抗体，抗電位依存性陰イオンチャネル（voltage-dependent anion channel, VDAC）抗体，抗チューブリン（tubulin）抗体もしくは CBB 染色で評価した総タンパクを用いて目的タンパクの発現量を標準化した。

タンパクアセチル化修飾およびミトコンドリア生合成，脂肪酸代謝にかかわるタンパクの測定

一次抗体にはアセチルリジン（acetylated-lysine），SIRT3，GAPDH，VDAC（Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA），ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター- γ 共役因子 1 α （peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α ），シトクロム c オキシダーゼサブユニット 1（mitochondrially encoded cytochrome c oxidase 1, MTCO1），CD36，カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1B（carnitine palmitoyltransferase 1B, CPT1B），カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2

（carnitine palmitoyltransferase 2, CPT2），長鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ（acyl-CoA dehydrogenase, long-chain, ACADL），エノイル CoA ヒドラターゼ/3-ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ（enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, EHHADH），Tubulin（Abcam, Cambridge, UK）を用い，二次抗体には horseradish peroxidase（HRP）標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体（Abcam, Cambridge, UK）もしくは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）を用いた。

3.2.7 骨格筋における NAD⁺代謝物の測定

採取した骨格筋組織（30–50 mg）をサンプルとして 3.1.4 で記述したメタボロミクス解析の方法を用いて，NAD⁺代謝物を評価した。

3.2.8 免疫沈降 - 質量分析法

免疫沈降

- 1) 骨格筋凍結組織 100 mg に免疫沈降用バッファー^{*6} 200 μ L を加えてポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。
- 2) 4°Cで 10,000 g, 10 分間遠心し, 上清を回収した。BCA 法によりタンパク濃度を測定して, 免疫沈降用バッファーを用いて 5 mg/mL に調整し, 免疫沈降用サンプルとした。
- 3) 免疫沈降用サンプル 100 μ L (500 μ g) にアガロース結合担体 (Protein A/G PLUS-Agarose; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 20 μ L 加えて, 4°Cで 4 時間ローテーターにて攪拌した。
- 4) 4°Cで 16,000 g, 5 分間遠心し, 上清を新しいチューブに移し, ペレットは破棄した。
- 5) 抗アセチルリジン抗体を 10 μ g 加えて, 一晚ローテーターにて攪拌した。
- 6) アガロース結合担体を 40 μ L 加えて 4°Cで 6 時間ローテーターにて攪拌した。
- 7) 4°Cで 16,000 g, 5 分間遠心し, 上清を破棄した。ペレットを免疫沈降洗浄用バッファー^{*7}にて 3 回洗浄した。
- 8) 得られたアセチル化タンパクと担体の複合体を用いて, 後述の質量分析を行った。

^{*6} 免疫沈降用バッファー組成: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton-X, 1 μ M トリコスタチン A, 5 mM ニコチンアミド, 10 mM 酪酸ナトリウム, タンパク分解酵素阻害薬

^{*7} 免疫沈降洗浄用バッファー組成: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 5 mM ニコチンアミド, 5 mM 酪酸ナトリウム, タンパク分解酵素阻害薬

質量分析

- 1) 免疫沈降で得られた免疫複合体と結合した担体に 60 μ L の 1.5 $\times$ LDS を加え, 100°Cで 15 分間加熱した。遠心を行い, 担体をペレットとして破棄し, 10% Bis-Tris NuPAGE ゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と 2-メルホリノエタンスルホン酸 (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES) バッファー を用いた SDS-PAGE を行った。
- 2) ゲルを 10 等分し, ゲル片を 25 mM 重炭酸アンモニウムとアセニトリルで洗浄した (脱色)。
- 3) 10 mM DTT を加えて 60°Cで反応させた後に, 50 mM ヨードアセトミドを加えて室温で振盪させた (還元, アルキル化)。

- 4) トリプシン溶液 (Sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI, USA) を加えて, 37°Cで4時間反応させた (ゲル内消化).
- 5) ペプチド分析用逆相カラム (Waters Nano Acquity HPLC system; Waters, Milford, MA, USA) によりペプチド混合物を分離し, 質量分析計 (ThermoFisher Q Exactive HF; Thermo Scientific, Tokyo, Japan) を用いた nanoLC-MS/MS による質量分析を行った.

データ解析

- 1) 質量分析により得られたデータは Mascot データベースソフトウェア ver. 2.4 (Matrix Science, London, UK) を用いてタンパクを特定した.
- 2) ラベルフリー定量法である normalized spectral abundance factor (NSAF) を算出し, タンパクの発現量を相対的に評価した.
- 3) 両群でタンパクの発現量を比較してステューデントの t 検定にて $p < 0.05$ のもの, および Sham 群と比較して HF 群で 1.5 倍以上増加しているタンパクを有意な増加と定義した.

3.2.9 骨格筋における CS 活性の測定

骨格筋凍結組織 100 mg に酵素活性測定用ホモジネートバッファー^{*8}を 400 μ L 加えてポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした. アルブミンスタンダードを用いた BCA 法により上清溶液のタンパク濃度を測定して 1 mg/mL に調整し, 酵素活性測定用サンプルとした. キュベット (Kartell Labware, Milano, Italy) にクエン酸合成酵素 (Citrate synthase, CS) 活性測定用反応液^{*9}を入れ, 酵素活性測定用サンプル 30 μ L を加えた後, 0.5 mM オキサロ酢酸を添加し, 分光光度計 (Multiskan™ GO spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 412 nm における吸光度の変化を 3 分間測定した. 酵素活性量は得られた吸光度の変化をタンパク量により補正することで算出した.

^{*8} 酵素活性測定用ホモジネートバッファーの組成: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10% Glycerol (wt/vol), 0.02% Brij-35 (wt/vol), 1 mM DTT

^{*9} CS 活性測定用反応液の組成: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3.33 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM DTNB, 10 mM Acetyl-CoA

3.2.10 骨格筋における β -HAD 活性の測定

CS 活性測定の際に作成した酵素活性測定用サンプルを用いた. キュベットに β -ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ (β -HAD) 活性測定用反応液^{*10}を入れ, 酵素活性測定用サンプルを 40 μ L 加えた後, 0.1 mM アセトアセチル CoA を添加し, 分

光光度計を用いて 340 nm における吸光度の変化を 5 分間測定した。酵素活性量は得られた吸光度の変化をタンパク量により補正することで算出した。また、培養骨格筋細胞の β -HAD 活性についても同様の方法を用いて測定を行った。

*¹⁰ β -HAD 活性測定用反応液の組成：50 mM imidazole (pH 7.4), 0.15 mM NADH

3.2.11 骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能の測定

骨格筋線維の細胞膜透過処理

- 1) マウスの安楽死後に摘出した骨格筋を、直ちに氷冷した組織保存溶液 (BIOPS^{*11}) に浸した。

*¹¹ BIOPS (pH 7.1) の組成：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 DTT, 50 mM MES hydrate

- 2) BIOPS 内で周辺組織を可及的に除去し、18 ゲージ注射針 2 本を用いて骨格筋線維をほぐすように処置を行った。
- 3) サポニンを含む BIOPS 溶液^{*12} 内に入れ、氷上で 30 分間振盪し、細胞膜透過処理を行った。

*¹² BIOPS 溶液 1 mL にサポニン 5 mg を溶解してストック溶液 (5 μ g/ μ L) を作成、細胞膜透過処理を行う際に BIOPS 溶液 2 mL にストック溶液を 20 μ L 溶解し、最終濃度 0.05 μ g/ μ L とした。

- 4) ミトコンドリア呼吸能測定用緩衝液 (mitochondrial respiration medium, MiR05^{*13}) で 2 回、各 10 分間洗浄した。

*¹³ MiR05 の組成：0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20 mM Taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 60 mM Potassium lactobionate, 1 g/L BSA

ミトコンドリア呼吸能測定

細胞膜透過処理を施した骨格筋線維を用いて、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置 (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) で測定を行った。得られたデータは Datlab ソフトウェア ver.6 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) で解析し、湿重量で補正した。

- 1) 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。チャンバー内は 37°C で常時攪拌しながら測定を実施した。
- 2) 細胞膜透過処理を施した骨格筋 1.5–3 mg をチャンバー内に加えた。
- 3) ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I (mitochondrial respiratory chain complex 1, CI) に関連する基質であるリンゴ酸 (malate, 2 mM) を加えた。CI に関連するブ

ロトンリーク (proton leak, LEAK) の際に生じる酸素消費速度 (CI_LEAK) を評価した。

- 4) アデノシン二リン酸 (ADP, 5 mM), 塩化マグネシウム (MgCl_2 , 5 mM) を加えた。CIに関連する酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) による酸素消費速度 (CI_OXPHOS) を評価した。
- 5) 脂肪酸酸化 (fatty acid oxidation, FAO) に関連する基質であるオクタノイルカルニチンを加えた。FAO 存在下での CIに関連する OXPHOS による酸素消費速度 (CI_OXPHOS with FAO) を評価した。
- 6) ミトコンドリア外膜の構造が保たれていることを確認するためにサイトクロム c (cytochrome c, 10 μM) を加えた。投与前後で酸素消費速度が 10%以上上昇した場合はミトコンドリア外膜の構造が適切に保たれていないと判断して、計測は中止とした。
- 7) ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体II (mitochondrial respiratory chain complex 2, CII) に関連する基質であるコハク酸 (succinate, 2 mM) を加えた。FAO 存在下での CI と CII に関連する OXPHOS による酸素消費速度 (CI+II_OXPHOS with FAO) を評価した。
- 8) CI の阻害剤であるロテノン (rotenone, 0.5 μM) を加えた。FAO 存在下での CII に関連する OXPHOS による酸素消費速度 (CII_OXPHOS) を評価した。
- 9) ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体III (mitochondrial respiratory chain complex 3, CIII) の阻害剤であるアンチマイシン A (antimycin A, 2.5 μM) を加え、ミトコンドリアに関連する呼吸を停止させ、測定を終了した。

3.3 実験3 培養骨格筋細胞における SIRT3 がミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾に及ぼす影響の検討

3.3.1 細胞種と培養条件

マウス骨格筋芽細胞株である C2C12 細胞を 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) および 100 IU/mL ペニシリンと 100 IU/mL ストレプトマイシン (抗生剤) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, LO, USA) を用いて 37°C, 5% 二酸化炭素環境下のインキュベーター内において増殖させた。

3.3.2 実験デザイン

C2C12 細胞に対して後述するように RNA 干渉法を用いて SIRT3 をノックダウンした。48 時間培養した後に細胞を回収し、免疫ブロット法、酵素活性測定を行った。

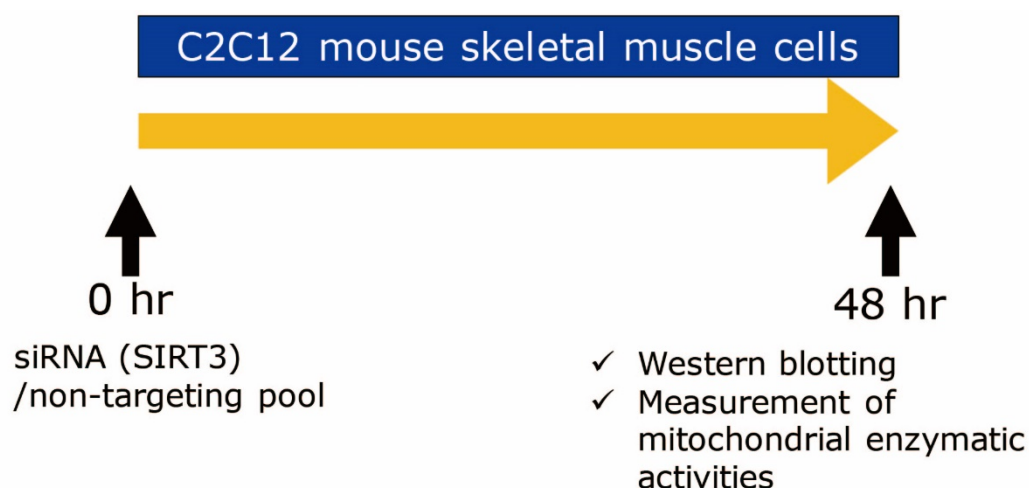


図 3-4 実験3のプロトコール。

3.3.3 培養骨格筋細胞に対する RNA 干渉法を用いた SIRT3 ノックダウン

- 1) C2C12 細胞を 1.2×10^6 個ずつ 75 cm² フラスコ (CELLSTAR® 658175; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) に播種し、37°C, 5% 二酸化炭素環境下のインキュベーター内において一晩培養した。
- 2) SIRT3 small interfering RNA (siRNA) (ON-TARGET plus Mouse Sirt3, L-048921-00-0005; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) および対照として non-targeting pool (ON-TARGET plus Non-targeting Pool; D-001810-10-50, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を siRNA 溶解バッファーを用いて溶解した。

- チューブ 1 に siRNA もしくは non-targeting pool, チューブ 2 に DharmaFECT トランスフェクション試薬 (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を入れ, 無血清培地 (血清, 抗生物質を含まない) で希釈した. 室温で 5 分間静置した.

チューブ 1		チューブ 2			
siRNA/Non-targeting pool	無血清培地	DharmaFECT	無血清培地	完全培地液量 (mL/フラスコ)	プレーティング液量 (mL/フラスコ)
10 μ L	990 μ L	60 μ L	940 μ L	8 mL	10 mL

- チューブ 2 の溶液をチューブ 1 に加えて, 室温で 20 分間静置した.
- 完全培地 (血清を含む, 抗生物質は含まない) を加えて, プレーティング液とした.
- フラスコ内を PBS で洗浄した後に siRNA もしくは non-targeting pool を含むプレーティング液を加えて 37°C, 5%二酸化炭素環境下のインキュベーター内で 48 時間培養した.

細胞回収

- PBS をフラスコ内に加えて洗浄した後に 0.05%EDTA トリプシンを 2 mL を加えて 37°Cで 5 分間保温した.
- 光学顕微鏡で細胞が浮遊しているのを確認した上で培地を 2 mL 加えてトリプシン作用を停止させた.
- 細胞浮遊液を 15 mL チューブに回収し, 4°Cで 1,500 rpm, 5 分間で遠心した. 上清を破棄し, PBS を加えて細胞を再混濁させた後に 4°Cで 1,500 rpm, 5 分間で遠心した. 上清を破棄し, 得られた細胞ペレットは別の行程で使用した. 長期保存する場合は-80°Cで凍結保存した.

3.3.4 培養骨格筋細胞からのミトコンドリア分画単離

- 免疫ブロット法に十分な量のミトコンドリア分画を得るため 2 フラスコから回収した細胞ペレットにミトコンドリア分画単離用バッファー^{*12}を加えた.
- 1 mL 注射用シリンジに 27 ゲージ注射針を装着し, 細胞混濁液の吸引排出を繰り返し (30 回), ホモジナイズした.
- 4°Cで 600 g, 5 分間で遠心し, 上清を新しい 1.5 mL チューブへ移し, ペレット (未破碎細胞や核分画を含む) は破棄した. この作業を計 2 度繰り返した.

- 4) 4°Cで 8,000 g, 10 分間遠心し, 上清 (細胞質分画を含む) を別の 1.5 mL チューブへ移した.
 - 5) 再度ペレットをミトコンドリア分画単離用バッファーに溶解し, 4°Cで 8,000 g, 10 分間遠心した.
 - 6) ペレット (ミトコンドリア分画) は免疫ブロット法に用いるまで凍結保存した.
- *¹² ミトコンドリア分画単離用バッファー組成: 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 220 mM Mannitol, 0.07 M Sucrose

3.3.5 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞を用いた免疫ブロット法

- 1) 培養骨格筋細胞より得られた細胞ペレット (3.3.2) ならびにミトコンドリア分画 (3.2.3) を氷上で解凍した.
 - 2) 細胞溶解バッファーを入れ, 4°Cで 15,000 rpm, 20 分間遠心し, 上清を新しいチューブに移し, ペレットは破棄した.
- 以降は 3.2.6 のタンパク濃度調整から同様の行程を行った.

3.3.6 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における β -HAD 活性の測定

細胞を回収し, 得られた細胞ペレットへ酵素活性測定用ホモジネートバッファーを加えた. 以降は 3.2.10 と同様の行程を行った.

3.4 統計学的解析

統計処理は, 統計解析ソフトウェア GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った. 連続変数は平均値 $\pm$ 標準偏差 (および標準誤差) もしくは中央値, 四分位範囲 (interquartile range, IQR) (第 1 四分位数, 第 3 四分位数) で表した. 2 群間の平均値の差の検定はステューデントの t 検定もしくはマン・ホイットニーの U 検定で行った. 3 群間の平均値の差の検定は分散分析 (analysis of variance, ANOVA) を用いて行い, ポストホックテストとしてテューキー (Tukey) の多重比較法により検定した. $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した.

4 実験結果

4.1 実験1 心不全患者における血漿アセチルリジンと運動耐容能の関連についての検討

4.1.1 患者背景

患者背景を表1に示す。心不全の基礎心疾患としては虚血性心筋症が3例、非虚血性心疾患として高血圧性心臓病が2例、拡張型心筋症が4例、心臓弁膜症が1例であった。心臓超音波検査で得られた左室駆出率は $25.0 \pm 6.0\%$ と低下し、脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide, BNP) も161.3, IQR (84.9, 346.2) と上昇していた。心肺運動負荷試験により測定した peak VO_2 は $15.6 \pm 5.4 \text{ mL/kg/min}$ と低下していた。またほぼ全例で ACE 阻害薬/アンジオテンシンII受容体拮抗薬, β 遮断薬および利尿剤が導入されており, 心不全に対する標準的な薬物治療が行われていると考えられた。

表 1 患者背景.

	(n = 10)
男性, n	9
年齢, 歳	57.0 ± 12.3
基礎心疾患 :	
虚血性心筋症, n	3
高血圧性心臓病, n	2
拡張型心筋症, n	4
心臓弁膜症, n	1
NYHA	
II, n	6
III, n	4
左室駆出率, %	25.0 ± 6.0
BNP, pg/mL	161.3, IQR (84.9, 346.2)
心肺運動負荷試験 :	
Peak VO ₂ , mL/kg/min	15.6 ± 5.4
AT, mL/kg/min	8.8 ± 1.5
VE/VCO ₂	33.1, IQR (29.9, 42.2)
薬物治療 :	
ACE 阻害薬/アンジオテンシンII受容体拮抗薬, n	10
β 遮断薬, n	10
利尿剤, n	8

連続変数は平均値±標準偏差（左室駆出率, peak VO₂, AT）もしくは中央値, IQR（第1四分位数, 第3四分位数）（BNP, VE/VCO₂）.

4.1.2 心不全患者における血中メタボロミクス解析

血中メタボロミクス解析では233の代謝物が検出され、対照者群と比較して心不全患者群でアセチルリジン、メチル化アルギニン、リン脂質代謝物、尿素回路関連代謝物が有意に上昇していた。これらの代謝物のうち、運動耐容能の指標である peak VO₂ と負の相関を示した血漿中の代謝物として非対称性メチル化アルギニン

(asymmetric dimethylarginine, ADMA) ($r = -0.74$)、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 ($r = -0.81$) があり、アセチルリジンが最も強い負の相関を示した (図 4-1A, B)。血漿アセチルリジンは心不全の重症度分類であるニューヨーク心臓協会 (NYHA) 重症度分類においてより重症度の高い患者群で高い値を示した (図 4-1C)。また心不全患者にて血漿アセチルリジンは運動耐容能の指標である peak VO₂ に加えて、AT と負の相関を示し、VE/VCO₂ と正の相関を示した (図 4-1D-F)。

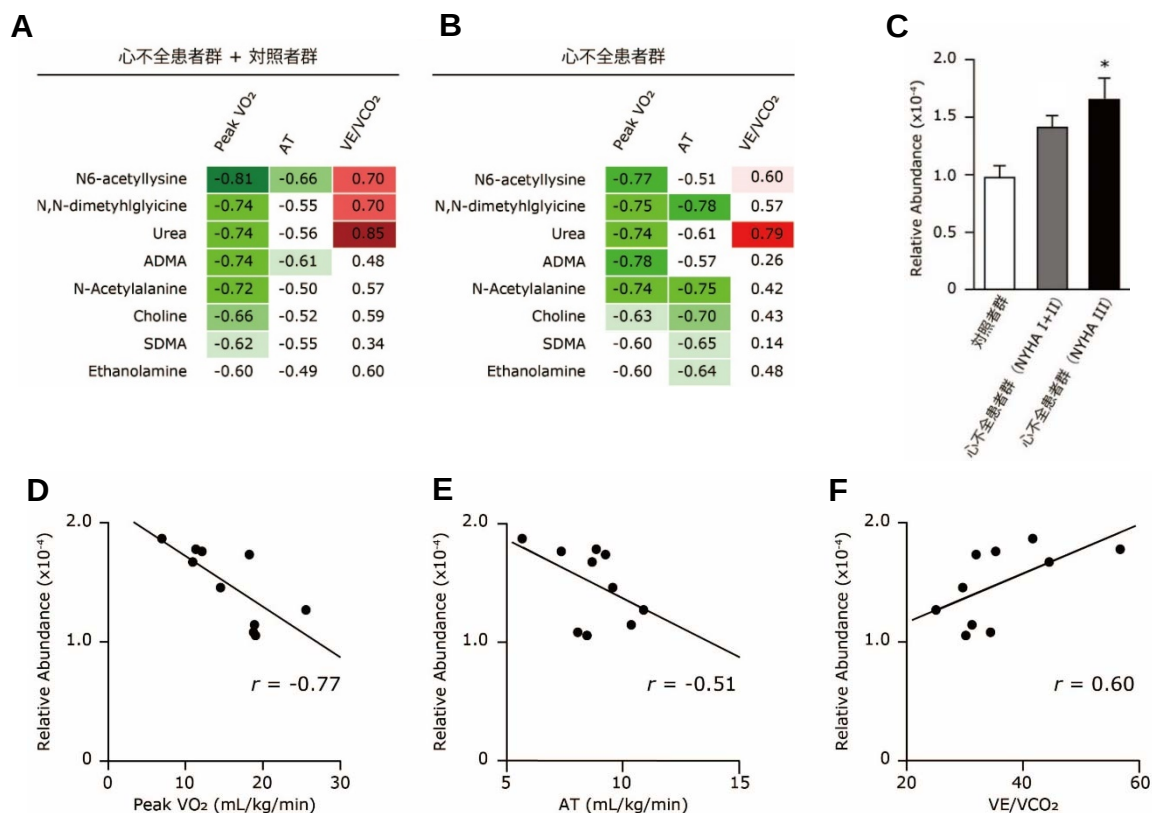


図 4-1 心不全患者群+対照者群 (n=15) (A) および心不全患者群のみ (n=10) (B) における peak VO₂, AT, VE/VCO₂ と相関を有する血中代謝物. (C) 血漿アセチルリジンと NYHA 重症度分類. 血漿アセチルリジンと peak VO₂ (D), AT (E), VE/VCO₂ (F) との相関. バーグラフは平均値±標準誤差. 心不全患者群 n=10, 対照者群 n=5. * $p < 0.05$ vs. 対照者群.

4.2 実験2 心筋梗塞後心不全モデルマウス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についての検討

4.2.1 心臓超音波検査, 組織重量計測

図4-2に心筋梗塞手術4週後のHF群マウスならびにSham群マウスにおける心臓超音波検査Mモード法の代表的画像を, また表2に心臓超音波検査所見ならびに組織重量計測の結果を示す. HF群はSham群と比較して左室内腔が拡大し, 左室内径短縮率は低下した. またHF群はSham群と比較して左室前壁厚が減少したが左室後壁厚は増加しており, 心筋梗塞が適切に作成され, 心不全を呈しているモデルと考えられた.

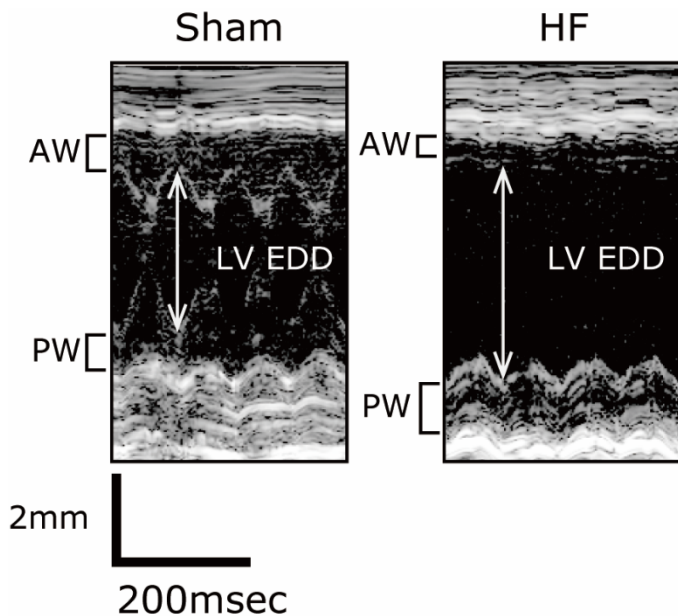


図4-2 心筋梗塞手術4週後の心臓超音波検査Mモード法の代表的画像.

(左) Sham 手術群, (右) 心筋梗塞手術後心不全 (HF) 群. AW (anterior wall), 前壁; PW (posterior wall), 後壁; LV EDD (left ventricular end-diastolic diameter), 左室拡張末期径.

表 2 心筋梗塞手術 4 週後の心臓超音波検査所見, 体重および組織重量計測値.

	Sham 群	HF 群
n	11	11
体重および組織重量		
体重, g	25.6 ± 0.2	25.0 ± 0.3
心重量, mg	116.6 ± 1.4	154.0 ± 7.7*
肺重量体重比, mg/g	5.4 ± 0.04	7.6 ± 0.09*
骨格筋重量		
大腿四頭筋重量体重比, mg/g	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2
腓腹筋重量体重比, mg/g	5.5 ± 0.1	5.3 ± 0.1
ヒラメ筋重量体重比, mg/g	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01
心臓超音波検査所見		
心拍数, 拍/分	688 ± 7	658 ± 16
左室拡張末期径, mm	3.6 ± 0.1	4.9 ± 0.2*
左室収縮末期径, mm	1.5 ± 0.1	4.2 ± 0.2*
左室内径短縮率, %	56.7 ± 2.1	15.8 ± 1.3*
左室前壁厚, mm	0.7 ± 0.02	0.3 ± 0.01*
左室後壁厚, mm	0.8 ± 0.02	1.1 ± 0.06*

データは平均値 ± 標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Sham 群.

4.2.2 運動耐容能評価

心筋梗塞手術 4 週後の時点においてトレッドミルにより運動耐容能を評価した結果、HF 群で仕事量、走行距離および走行時間は Sham 群と比較して有意な低下を認めた (図 4-3A-C)。また peak VO_2 は Sham 群に比較して HF 群で有意に低値であった (図 4-3D)。なお呼吸交換比は両群間で有意差を認めず、同等の最大負荷がかかっていることが示された (図 4-3E)。

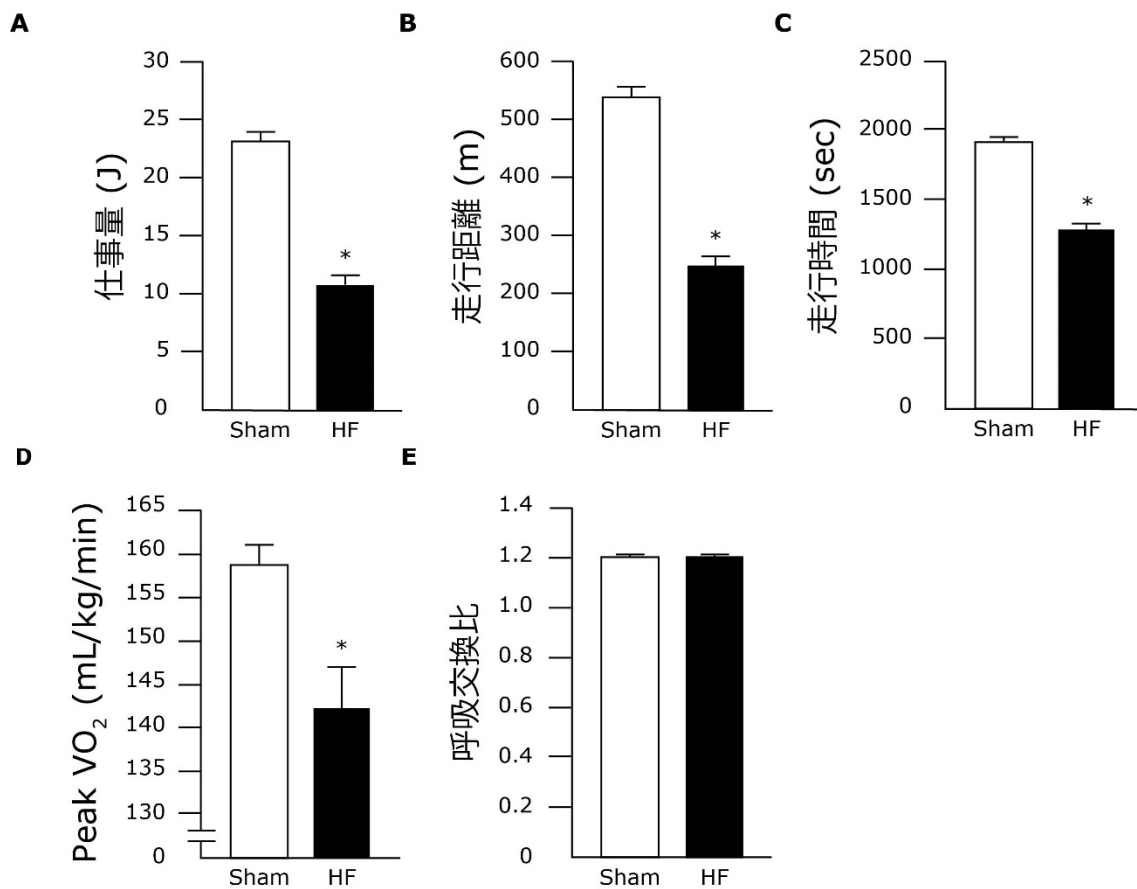


図 4-3 心筋梗塞手術 4 週後の運動耐容能.

仕事量 (A), 走行距離 (B), 走行時間 (C), peak VO_2 (D), 最大負荷時の呼吸交換比 (E). データは平均値 $\pm$ 標準誤差. 各群 $n = 8$. * $p < 0.05$ vs. Sham 群.

4.2.3 骨格筋におけるタンパクアセチル化修飾

骨格筋におけるリジン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、全組織抽出液では Sham 群と HF 群で有意な差を認めなかったのに対して、ミトコンドリア分画においては HF 群でリジンアセチル化修飾は有意に増加した (図 4-4)。

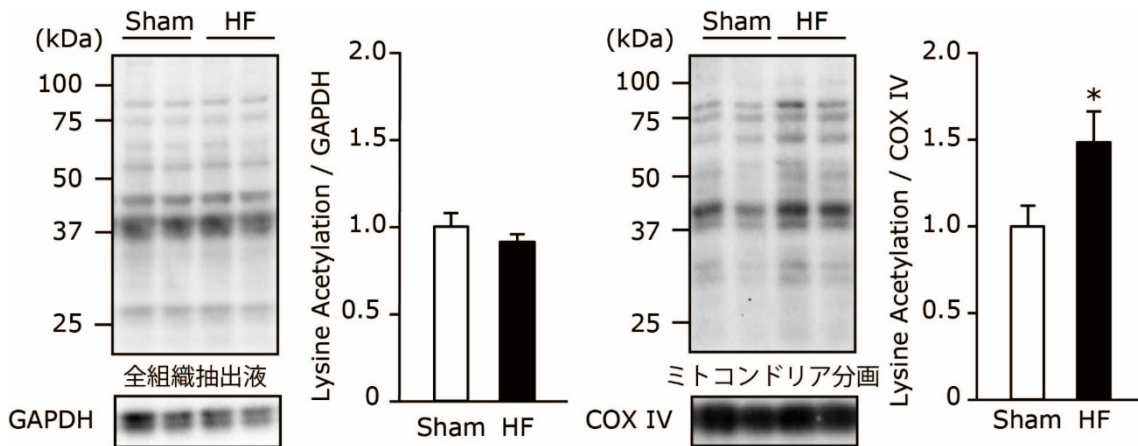


図 4-4 骨格筋における全組織抽出液とミトコンドリア分画のリジンアセチル化修飾 (左 ; GAPDH 比, 右 ; COX IV 比).

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

4.2.4 骨格筋における SIRT3 のタンパク発現と NAD⁺代謝物

ミトコンドリアに局在するミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾の調節に関与する脱アセチル化酵素である SIRT3 のタンパク発現を評価した。SIRT3 は HF 群で Sham 群と比較して有意に低下していた。また SIRT3 の脱アセチル化活性は NAD⁺依存性とされており、NAD⁺ (酸化型)、NADH (還元型)、NAD⁺/NADH 比を評価した。SIRT3 活性に関連するとされる NAD⁺、NAD⁺/NADH 比に両群間で有意差を認めなかった (図 4-5 B)。

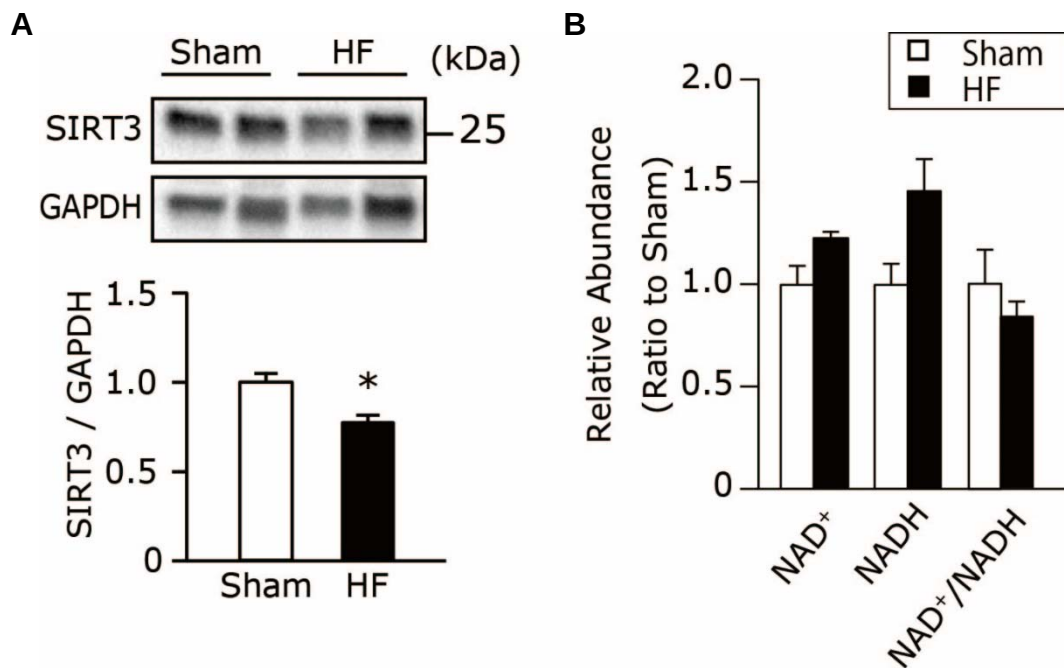


図 4-5 骨格筋における SIRT3 のタンパク発現量 (A), および NAD⁺代謝物 (B) . データは平均値±標準誤差. A; 各群 n=8. B; 各群 n=5-6. **p*<0.05 vs. Sham 群.

4.2.5 骨格筋における免疫沈降 - 質量分析法を用いたアセチル化タンパクの網羅的解析

抗アセチルリジン抗体を用いた免疫沈降法によりアセチル化タンパクを精製し，質量分析法による網羅的解析を行ったところ，151 のタンパクが検出され，うち 50 がミトコンドリアタンパクであった（図 4-6A）．HF 群では 50 のミトコンドリアタンパクが検出された一方で，Sham 群では一部のみ検出された（26 のミトコンドリアタンパク）．

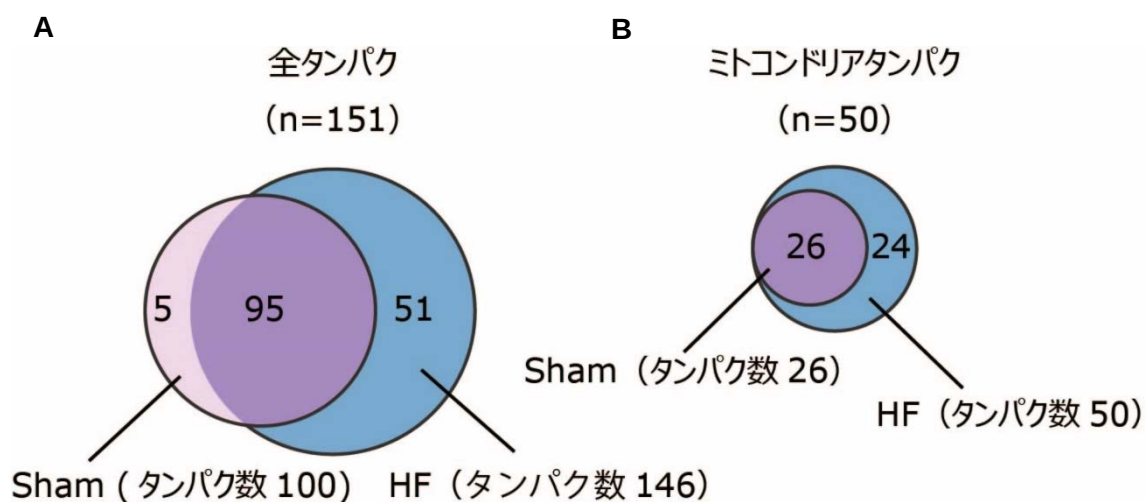


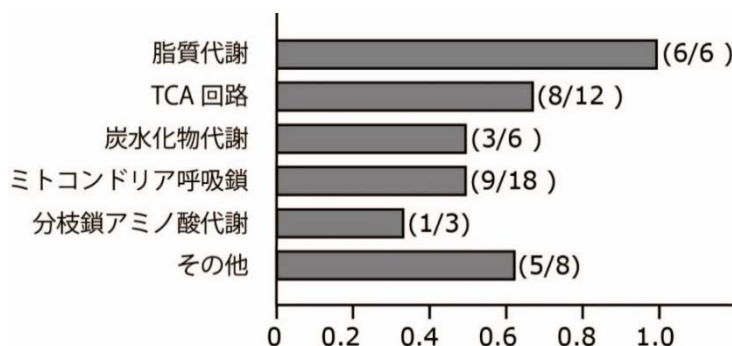
図 4-6 免疫沈降 - 質量分析法により検出されたアセチル化タンパク。

検出・同定されたすべてのタンパク（A; n = 151）と，そのうちのミトコンドリアに局在するタンパク（B; n = 50）．各群 n = 3.

4.2.6 骨格筋ミトコンドリアアセチル化タンパクに対する遺伝子オントロジー解析

アセチル化修飾を受けたミトコンドリアタンパクに対して遺伝子オントロジー解析を行ったところ、脂質代謝や炭水化物代謝、TCA 回路、分枝鎖アミノ酸代謝、電子伝達系に関連するタンパクが同定された (図 4-7A)．とりわけ ACADL やエノイル CoA ヒドラターゼ (enoyl-CoA hydratase, ECHS1)，三頭酵素サブユニット α (trifunctional enzyme subunit α , HADHA)，ケトアシル CoA チオラーゼ (ketoacyl-CoA thiolase, ACAA2) はいずれも脂肪酸 β 酸化酵素に属し、主要なアセチル化修飾の標的と考えられた (図 4-7B)．

A



B

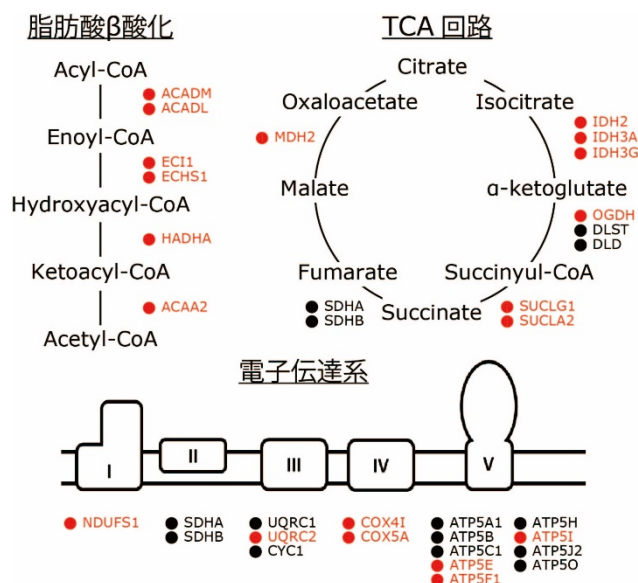


図 4-7 遺伝子オントロジー解析によるアセチル化修飾を受けたミトコンドリアタンパクの分類 (A) と主要なエネルギー代謝経路と関連するアセチル化タンパク

(B)．(A) バーの横の数字は検出されたタンパクの総数と HF 群でアセチル化修飾が増加しているタンパクの比を示した．(B) アセチル化修飾の増加しているタンパクを赤色で示した．減少もしくは不変のタンパクを黒色で示した．各群 n=3.

4.2.7 骨格筋におけるミトコンドリア生合成およびミトコンドリア量に関連するタンパク発現と CS 活性

ミトコンドリア生合成に関わるタンパクである PGC-1 α (図 4-8A) とミトコンドリア構成タンパクであり、ミトコンドリア量の指標である MTCO1 (図 4-8B) の発現を免疫ブロット法により評価したところ、両群間で差はなかった。同様にミトコンドリアの指標となる CS 活性 (図 4-8C) も有意差を認めなかったことから、ミトコンドリア量は両群で変化がないことが示された。

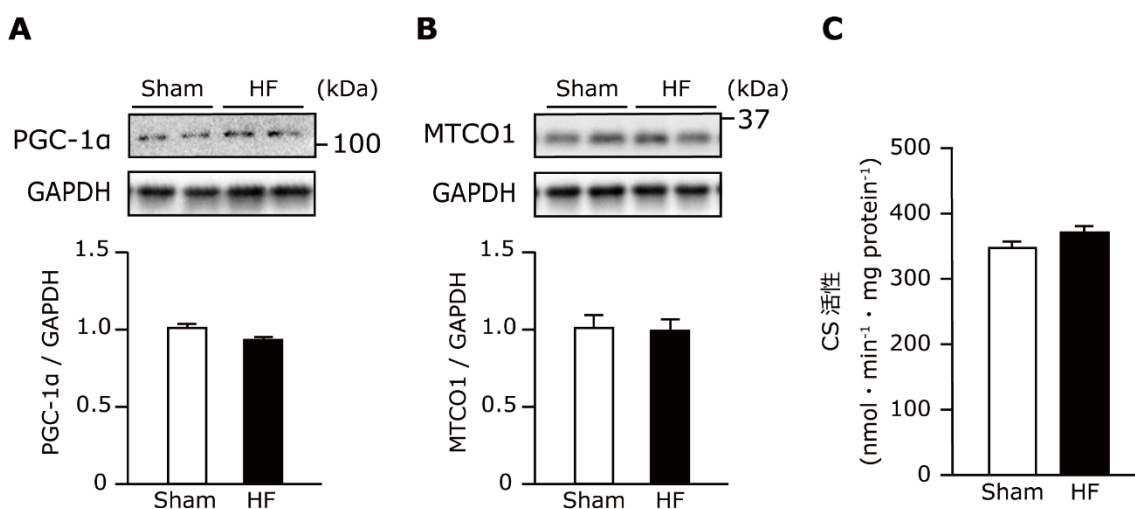


図 4-8 骨格筋における PGC-1 α (A), MTCO1 (B) のタンパク発現量と CS 活性値 (C).

免疫ブロット法の代表的バンドおよび定量解析 (GAPDH 比). データは平均値 $\pm$ 標準誤差. 各群 n = 8–10. * p < 0.05 vs. Sham 群.

4.2.8 骨格筋における脂肪酸代謝に関連するタンパク発現

脂肪酸代謝関連酵素のタンパクレベルでの変化を免疫ブロット法により評価した。脂肪酸の細胞内への取り込みに関連するタンパクである CD36 (図 4-9A) やミトコンドリアへの移送に関連するタンパクである CPT1B や CPT2 (図 4-9B-C), 加えて脂肪酸 β 酸化酵素である ACADL や EHHADH (図 4-9D, E) はいずれも免疫ブロット法で評価したタンパク発現に両群間で有意差は認めなかった。

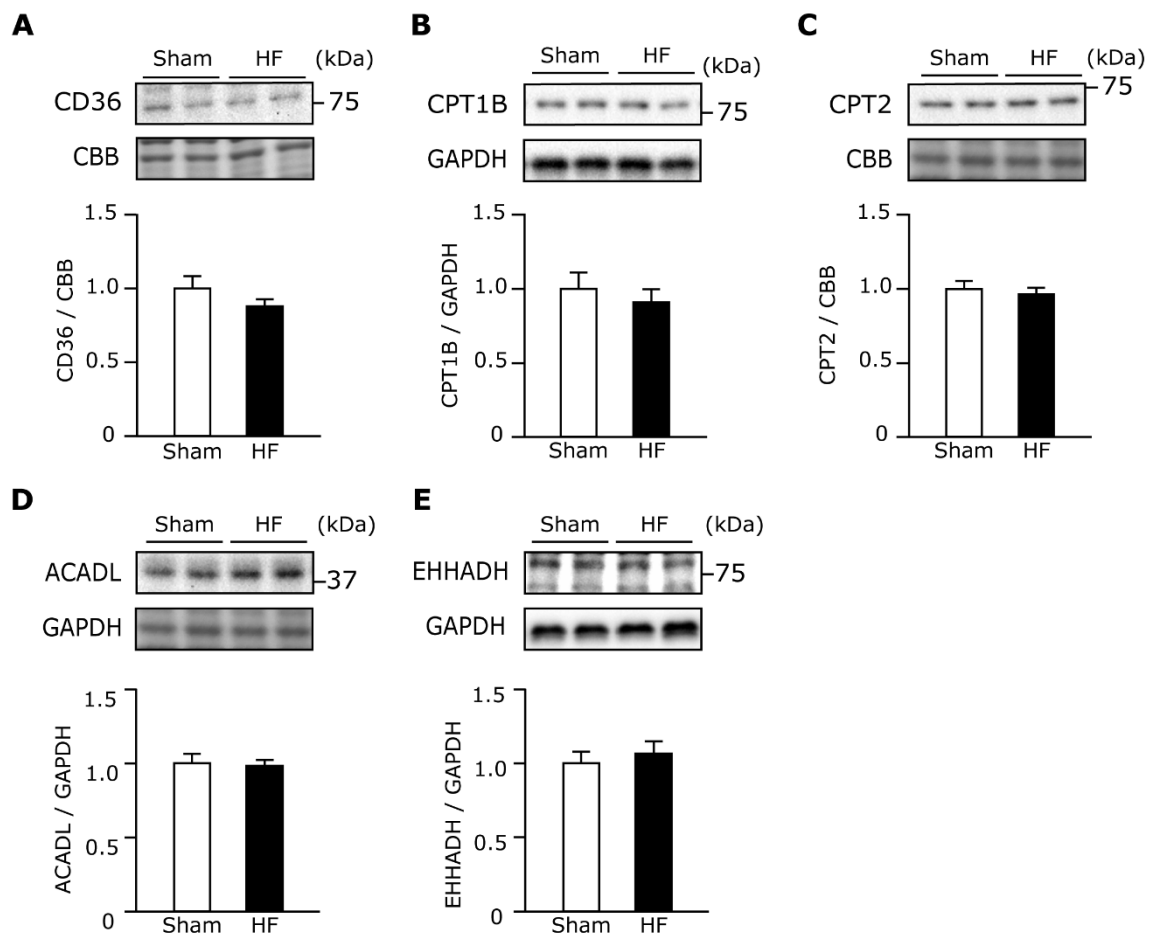


図 4-9 骨格筋における脂肪酸代謝関連酵素のタンパク発現量。

免疫ブロット法の代表的バンドおよび定量解析 (CBB 比もしくは GAPDH 比)。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。各群 $n = 6-10$ 。* $p < 0.05$ vs. Sham 群。

4.2.9 骨格筋における β -HAD 活性

骨格筋組織において脂肪酸 β 酸化に関連する酵素として β -HAD 活性を評価し, HF 群で有意な低下を認めた.

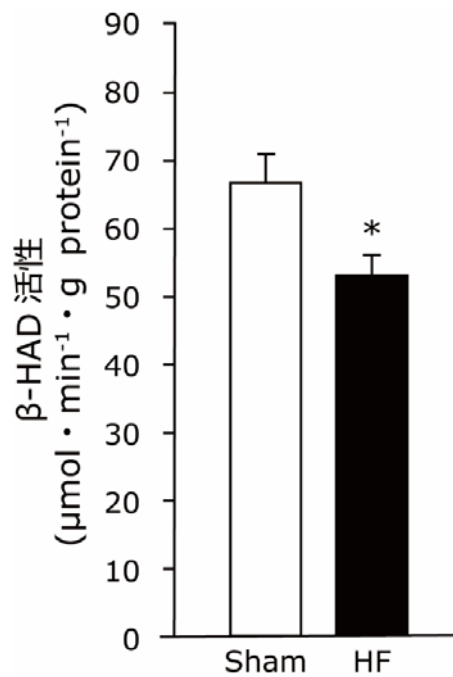


図 4-10 骨格筋における β -HAD 活性.

データは平均値 $\pm$ 標準誤差. 各群 $n=8$. * $p<0.05$ vs. Sham 群.

4.2.10 骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能

採取した骨格筋新鮮組織に細胞膜透過処理を施した後に、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置を用いて測定したミトコンドリア呼吸能の代表的な図を示す（図 4-11A）。また各基質を加えた際の呼吸能を定量，比較した結果を示す。CI_LEAK, CI_OXPHOS において両群間に有意な差は認めなかったものの，FAO の基質を加えた以降の，FAO 存在下での CI, CI+II, CIIに関連した酸化的リン酸化能は Sham 群と比較して HF 群で有意に低値であった（図 4-11B）。

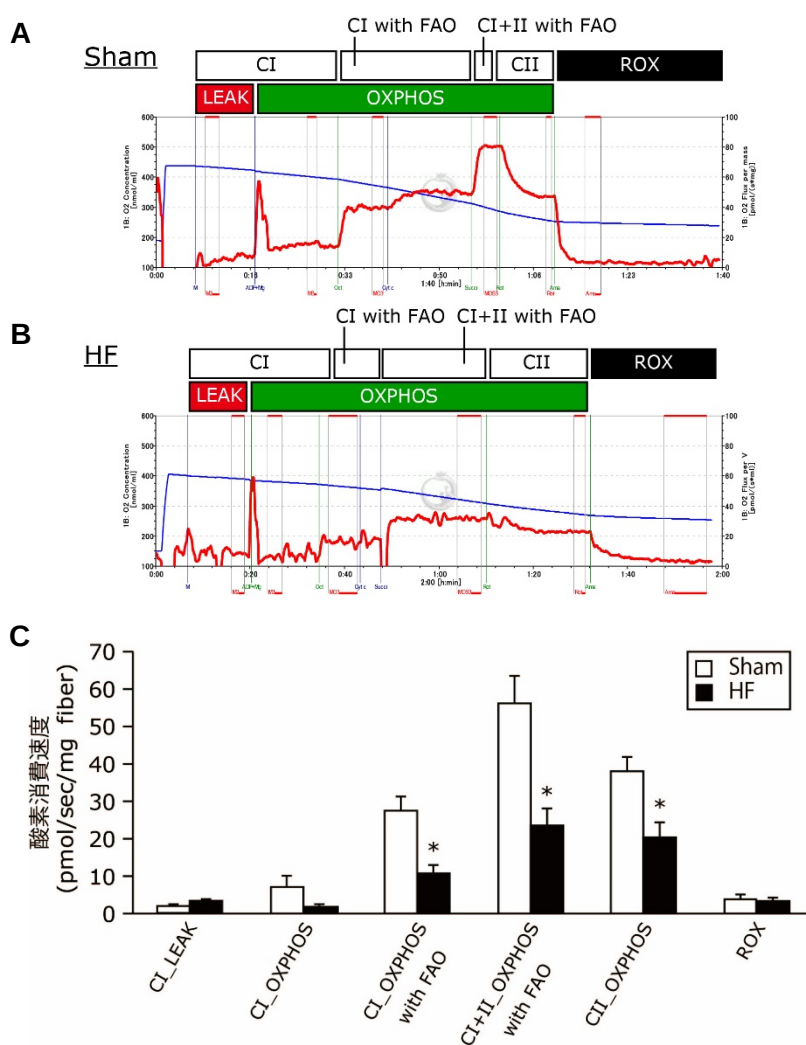


図 4-11 骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能。

高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置で測定したミトコンドリア呼吸能解析の代表的な図（A; Sham, B; HF）と定量結果（C）。データは平均値±標準誤差。各群 n = 8。* $p < 0.05$ vs. Sham 群。

4.3 実験3 培養骨格筋細胞における SIRT3 がミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾に及ぼす影響の検討

4.3.1 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における SIRT3 のタンパク発現

マウス培養骨格筋芽細胞である C2C12 細胞に RNA 干渉法を用いて SIRT3 をノックダウンした。免疫ブロット法により SIRT3 ノックダウン培養骨格筋細胞 (SIRT3 KD 群) における SIRT3 のタンパク発現量を、対照群である non-targeting pool を使用した群 (Non-targeting 群) と比較してノックダウン効率を評価した。SIRT3 KD 群で SIRT3 のタンパク量発現が 70%低下し (図 4-12), タンパクレベルにおいて SIRT3 がノックダウンされたことが確認された。

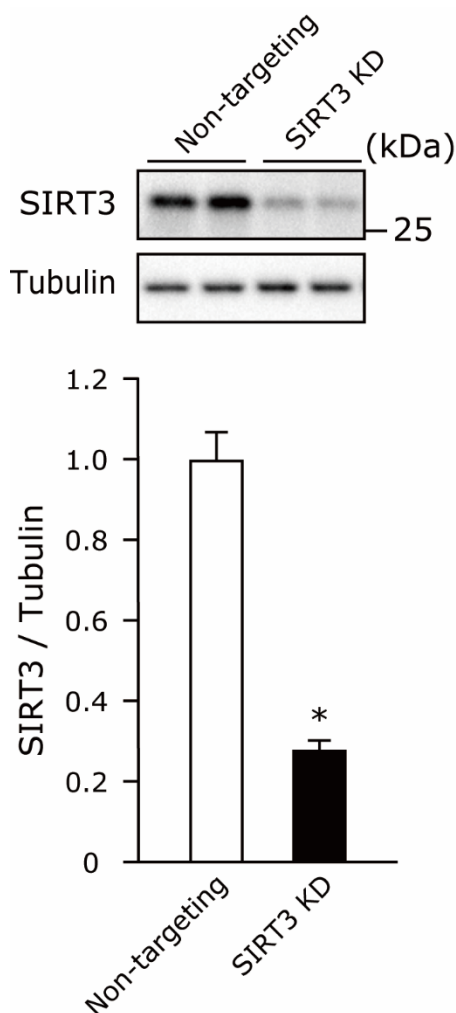


図 4-12 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における SIRT3 のタンパク発現量.

抗 SIRT3 抗体を用いた免疫ブロット法の代表的バンドおよび定量解析 (Tubulin 比). データは平均値±標準誤差. 各群 n = 4. * $p < 0.05$ vs. Non-targeting 群.

4.3.2 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞におけるタンパクアセチル化修飾

SIRT3 KD 培養骨格筋細胞におけるリジンアセチル化修飾を免疫ブロット法により評価した。全細胞抽出液においては Non-targeting 群と SIRT3 KD 群で有意な差を認めなかったのに対して、ミトコンドリア分画においては SIRT3 KD 群でリジンアセチル化修飾が有意に増加した (図 4-13)。

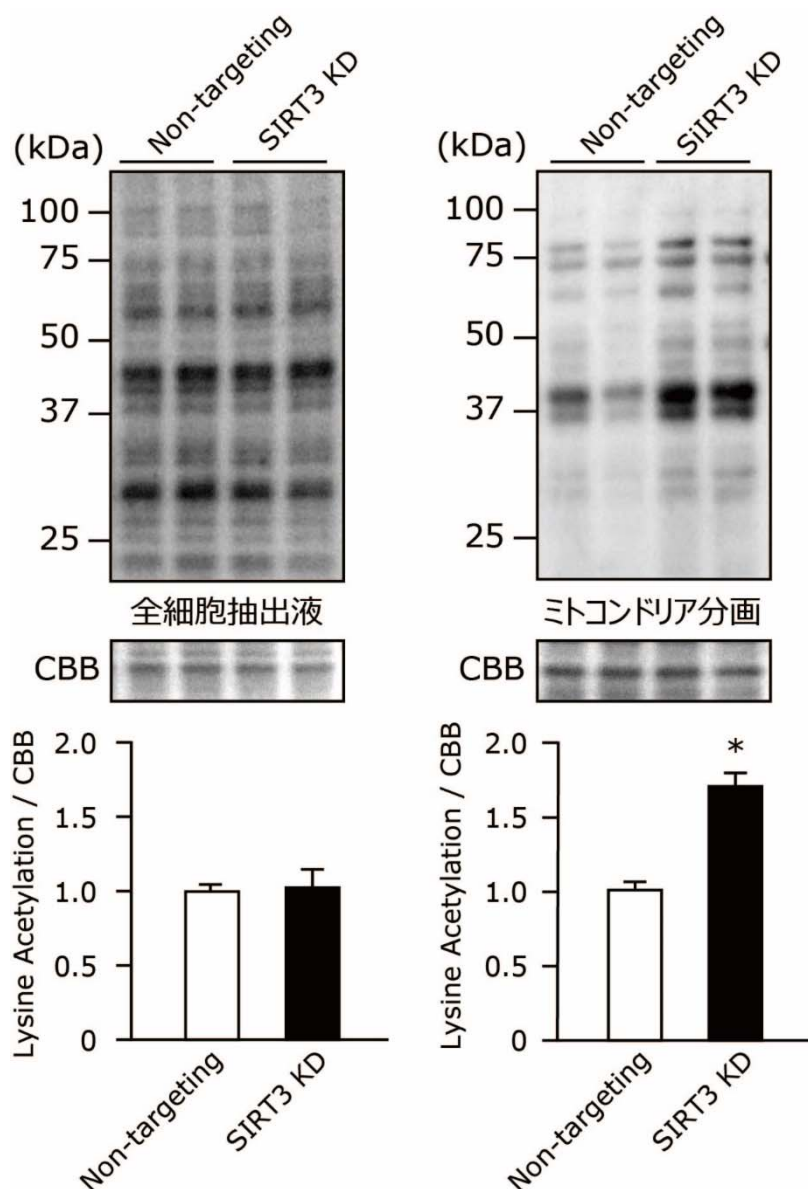


図 4-13 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における全細胞抽出液とミトコンドリア分画のリジンアセチル化修飾。抗アセチルリジン抗体を用いた免疫ブロット法の代表的バンドおよび定量解析 (CBB 比)。データは平均値±標準誤差。各群 n=3-4。* $p < 0.05$ vs. Non-targeting 群。

4.3.3 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における β -HAD 活性

SIRT3 KD 培養骨格筋細胞において脂肪酸 β 酸化に関連する酵素として β -HAD 活性を評価し, SIRT3 KD 群で有意に低下した (図 4-14).

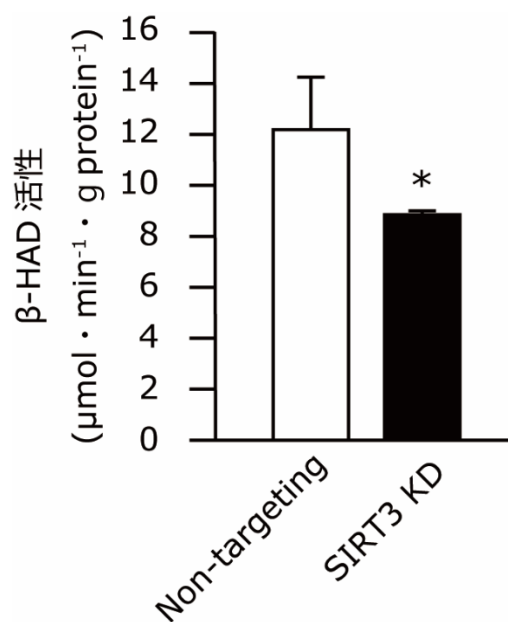


図 4-14 SIRT3 KD 培養骨格筋細胞における β -HAD 活性.

データは平均値 $\pm$ 標準誤差. 各群 n = 3. * $p < 0.05$ vs. Non-targeting 群.

5 考察

本研究において、まず血中メタボロミクス解析の結果より心不全患者において血漿アセチルリジンが増加し、運動耐容能と負の相関を示すことが明らかとなった。心肺運動負荷試験により測定される peak VO_2 は、心不全患者において非常に有用な予後予測因子であるものの、患者努力に依存するために正確な値が得られないこともしばしば経験されることから²⁰、これまで心不全のリスク層別化の手段として種々のバイオマーカーが提唱されている²¹。近年、心不全患者を対象とした血中メタボロミクス解析により、代謝物プロファイルの変化が予後を予測する上で非常に有用であることが示されている²²⁻²⁴。心不全における代謝の変化は心臓のみならず末梢の臓器においても生じており、共通した病態基盤を形成することが示唆される²⁵。しかしながら、現在まで心不全における運動耐容能低下と関連する血中代謝物に着目した検討はほとんど行われていない。今回の研究では血漿アセチルリジンが peak VO_2 と最も関連する代謝物であることを初めて見出した。一方で、ADMA、コリン代謝物、尿素が心不全患者で有意に増加していた点はこれまでの報告とも一致している^{22,26}。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。

次に、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ミトコンドリアにおいてタンパクのアセチル化修飾が亢進していることを明らかにし、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を示した。アセチル化修飾は当初からヒストンタンパクの正電荷を中和することによって遺伝子翻訳を調整することが知られていたが¹²、近年では非ヒストンタンパクに対するアセチル化修飾がミトコンドリアにおける代謝経路を調節する新たな機序として認識されてきている²⁷。Horton らは圧負荷心不全モデルマウスの心筋だけでなく、心不全患者より得られたヒト心筋標本においてもミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾が亢進していることを報告した¹⁶。今回の研究では心不全モデルマウスの骨格筋においてもミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾が起こっていることを明らかにした。さらに不全心では脂肪酸 β 酸化やTCA回路、分枝鎖アミノ酸代謝、電子伝達系を含む重要なエネルギー代謝経路に関連する蛋白のアセチル化修飾が亢進していることが報告されているが、それらの過去の報告とも一致している¹⁶。

ミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾は NAD^+ 依存性脱アセチル化酵素である SIRT3 の活性もしくはミトコンドリア内のアセチル CoA 濃度に依存する非酵素的な

アセチル化反応のバランスにより制御されている¹³。今回の研究ではNAD⁺もしくはNAD⁺/NADH 比に変化はなく、SIRT3 のタンパク発現低下が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亢進に影響を与えていた可能性が高いと考えられた。

骨格筋におけるアセチル化タンパクの網羅的解析により、心不全において脂肪酸β酸化、TCA 回路、分岐鎖アミノ酸代謝や電子伝達系を含むエネルギー代謝経路に関連したミトコンドリアタンパクがアセチル化修飾を受けていることを示した。とりわけ脂肪酸β酸化酵素のアセチル化修飾は骨格筋において、その酵素活性低下や脂肪酸存在下でのミトコンドリア呼吸能低下と関連すると考えられた。また、培養骨格筋細胞に対する SIRT3 ノックダウンによりミトコンドリア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の低下と関連した。これらの知見は骨格筋においてアセチル化修飾亢進が脂肪酸代謝の障害を介して心不全における運動耐容能低下の病態と関連していることを示唆する。糖尿病心^{28,29}や肥大心^{18,30,31}において SIRT3 の発現低下によるリジン残基のアセチル化修飾亢進によって、脂肪酸からグルコースへの心筋エネルギー代謝基質の変換をもたらしたという報告がある。この代謝基質の変換はむしろインスリン抵抗性によって心筋のエネルギー代謝効率の低下を惹起し、心不全の病態進展につながると考えられている^{32,33}。糖尿病心や肥大心と同様に、SIRT3 はミトコンドリアの酸化的リン酸化や酸化ストレスの調節を介して骨格筋機能を制御していることが示されている³⁴。心筋および骨格筋のいずれにおいても SIRT3 を介したアセチル化修飾の亢進はエネルギー基質の変換によって代謝を変化させ、心不全における運動耐容能低下を引き起こすと推測される。

今回の研究では、脂肪酸β酸化関連酵素のアセチル化修飾亢進が、酵素活性低下や脂肪酸存在下でのミトコンドリア呼吸能低下と関連していたことが示された。心不全患者から得られた骨格筋組織において、今回の研究でも用いた脂肪酸β酸化酵素のひとつであるβ-HAD を含む種々のミトコンドリア酵素が低下していたと報告されている^{7,35}。さらに当教室で行われた MRS を用いた研究では、心不全患者において筋細胞内脂肪の蓄積量が増加しており、骨格筋におけるエネルギー産生や全身の運動耐容能低下と強く関連していた¹¹。また、運動耐容能と運動中の骨格筋における脂肪酸酸化能との間には関連があることも報告されている^{36,37}。以上の報告を併せると、心不全患者では骨格筋における脂肪酸酸化の低下によって、運動中のエネルギー需要を満たすのに十分なエネルギー産生が効率的に行うことができないという相対的なエネルギー欠乏状態を生じるために、結果として運動耐容能の低下をきたすと考えられる。しかしながら、骨格筋での脂肪酸酸化を制御する分子機序はこれまで十分には解

明されてはいなかった。ミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化関連酵素のアセチル化修飾は酵素活性を制御していることを示す多くの報告がなされているものの、臓器によりその様式は異なる可能性がある。近年では Hirschey らが脂肪酸 β 酸化酵素のひとつである ACADL のアセチル化修飾亢進がその酵素活性を低下させ、肝臓への脂肪蓄積を来すことを示した一方で¹⁵、Lopaschuk らの研究グループはアセチル化修飾亢進により脂肪酸 β 酸化に関連する酵素の活性が上昇し、心筋脂肪酸酸化が増加することを報告している^{28,38,39}。骨格筋においては、脂肪酸 β 酸化関連酵素のアセチル化は脂質代謝を負に制御するという報告で一致している。今回の研究では骨格筋培養細胞において SIRT3 のノックダウンによりアセチル化修飾は亢進し、 β -HAD 活性の低下を認めたことから、骨格筋においては SIRT3 の発現低下を介したアセチル化修飾亢進は脂肪酸 β 酸化に対して抑制的に働き、脂肪酸存在下でのミトコンドリア呼吸能を低下させる^{36,40}。その結果、骨格筋における脂肪酸酸化低下はインスリン抵抗性と相まって心不全の骨格筋におけるエネルギー代謝障害と運動耐容能低下を引き起こすと考えられた。

本研究における限界としては第一に、*in vivo* で得られたデータは関連を示したにすぎず、アセチル化修飾と脂肪酸酸化障害もしくは運動耐容能低下における直接的な因果関係は不明である。骨格筋の脂肪酸酸化の調節におけるアセチル化修飾の役割をより直接的に証明するためには、骨格筋特異的 SIRT3 欠損マウスを用いた実験が必要である。第二に心不全において骨格筋 SIRT3 の発現低下が起こる機序、ならびにその上流にあたる機序は未だ明確になっていないことが挙げられるが、過去の検討では SIRT3 が栄養状態に応じて遺伝子転写制御を受けると報告されており、本研究においても同様の機序が関連している可能性がある。

6 総括および結論

本研究で得られた新知見を以下に述べる

- 1 心不全患者において血漿アセチルリジンが有意に上昇しており，運動耐容能の指標である peak VO_2 と強い負の相関を示した．
- 2 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が亢進しており，併せてミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素である SIRT3 の発現も低下していた．
- 3 マウス骨格筋におけるアセチル化タンパクの網羅的解析の結果からエネルギー代謝，特に脂肪酸酸化に関連するミトコンドリアタンパクで，よりアセチル化修飾が亢進しており，酵素活性ならびに脂肪酸存在下でのミトコンドリア呼吸能が低下していた．

これらの知見は心不全において骨格筋 SIRT3 の低下，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．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．

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するにあたり，本研究の機会を与えて頂くとともに，多くのご指導とご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 安斉俊久教授に深謝申し上げます．また北海道大学 大学院医学研究院 循環病態内科学教室 福島新助教には博士課程での研究全般・学位論文作成に，ご多忙の中，多くのご指導をして頂き大変感謝しております．

本研究にあたり，ご多忙の中ご助言頂きました北翔大学 大学院生涯スポーツ学研究科 沖田孝一教授，また日頃より多くのご指導とご協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の高田真吾先生，降旗高明先生，松本純一先生，片山貴史先生，中島孝之先生，白川亮介先生，前川聡先生，南部秀雄先生，尾畑嘉一先生，山梨克真先生，横田卓助教，絹川真太郎講師に感謝申し上げます．

また本論文作成に当たり，ご多忙の中ご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，多大なご協力を頂きました循環病態内科学教室 実験助手の山根美和子様，池田則子様，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致します．

引用文献

- 1 Mancini, D. M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L. H., Jr. & Wilson, J. R. Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 83, 778-786 (1991).
- 2 Franciosa, J. A., Park, M. & Levine, T. B. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am. J. Cardiol.* 47, 33-39 (1981).
- 3 Wilson, J. R., Martin, J. L. & Ferraro, N. Impaired skeletal muscle nutritive flow during exercise in patients with congestive heart failure: role of cardiac pump dysfunction as determined by the effect of dobutamine. *Am. J. Cardiol.* 53, 1308-1315 (1984).
- 4 Jondeau, G., Katz, S. D., Zohman, L., Goldberger, M., McCarthy, M., Bourdarias, J. P. & LeJemtel, T. H. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. *Circulation* 86, 1351-1356 (1992).
- 5 Sullivan, M. J., Knight, J. D., Higginbotham, M. B. & Cobb, F. R. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. *Circulation* 80, 769-781 (1989).
- 6 Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Okita, K. & Tsutsui, H. Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int. Heart J.* 56, 475-484 (2015).
- 7 Sullivan, M. J., Green, H. J. & Cobb, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 81, 518-527 (1990).
- 8 Fulster, S., Tacke, M., Sandek, A., Ebner, N., Tschope, C., Doehner, W., Anker, S. D. & von Haehling, S. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur. Heart J.* 34, 512-519 (2013).
- 9 Okita, K., Yonezawa, K., Nishijima, H., Hanada, A., Ohtsubo, M., Kohya, T., Murakami, T. & Kitabatake, A. Skeletal muscle metabolism limits exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98, 1886-1891 (1998).
- 10 Mancini, D. M., Coyle, E., Coggan, A., Beltz, J., Ferraro, N., Montain, S. & Wilson, J. R. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation* 80, 1338-1346 (1989).

- 11 Hirabayashi, K., Kinugawa, S., Yokota, T., Takada, S., Fukushima, A., Suga, T., Takahashi, M., Ono, T., Morita, N., Omokawa, M., Harada, K., Oyama-Manabe, N., Shirato, H., Matsushima, S., Okita, K. & Tsutsui, H. Intramyocellular lipid is increased in the skeletal muscle of patients with dilated cardiomyopathy with lowered exercise capacity. *Int. J. Cardiol.* 176, 1110-1112 (2014).
- 12 Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352 (1997).
- 13 Fukushima, A. & Lopaschuk, G. D. Acetylation control of cardiac fatty acid beta-oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 2211-2220 (2016).
- 14 Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. & Guan, K. L. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000-1004 (2010).
- 15 Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Jr., Alt, F. W., Kahn, C. R. & Verdin, E. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464, 121-125 (2010).
- 16 Horton, J. L., Martin, O. J., Lai, L., Riley, N. M., Richards, A. L., Vega, R. B., Leone, T. C., Pagliarini, D. J., Muoio, D. M., Bedi, K. C., Jr., Margulies, K. B., Coon, J. J. & Kelly, D. P. Mitochondrial protein hyperacetylation in the failing heart. *JCI Insight* 2, 1-14 (2016).
- 17 Sack, M. N. The role of SIRT3 in mitochondrial homeostasis and cardiac adaptation to hypertrophy and aging. *J. Mol. Cell Cardiol.* 52, 520-525 (2012).
- 18 Chen, T., Liu, J., Li, N., Wang, S., Liu, H., Li, J., Zhang, Y. & Bu, P. Mouse SIRT3 attenuates hypertrophy-related lipid accumulation in the heart through the deacetylation of LCAD. *PLoS One* 10, e0118909 (2015).
- 19 Jing, E., O'Neill, B. T., Rardin, M. J., Kleinriders, A., Ilkeyeva, O. R., Ussar, S., Bain, J. R., Lee, K. Y., Verdin, E. M., Newgard, C. B., Gibson, B. W. & Kahn, C. R. Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation. *Diabetes* 62, 3404-3417 (2013).
- 20 Mezzani, A., Corra, U., Bosimini, E., Giordano, A. & Giannuzzi, P. Contribution of peak respiratory exchange ratio to peak VO₂ prognostic reliability in patients with

- chronic heart failure and severely reduced exercise capacity. *Am. Heart J.* 145, 1102-1107 (2003).
- 21 Bayes-Genis, A., de Antonio, M., Vila, J., Penafiel, J., Galan, A., Barallat, J., Zamora, E., Urrutia, A. & Lupon, J. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 158-166 (2014).
 - 22 Cheng, M. L., Wang, C. H., Shiao, M. S., Liu, M. H., Huang, Y. Y., Huang, C. Y., Mao, C. T., Lin, J. F., Ho, H. Y. & Yang, N. I. Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure: diagnostic and prognostic value of metabolomics. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65, 1509-1520 (2015).
 - 23 Zordoky, B. N., Sung, M. M., Ezekowitz, J., Mandal, R., Han, B., Bjorndahl, T. C., Bouatra, S., Anderson, T., Oudit, G. Y., Wishart, D. S., Dyck, J. R. & Alberta, H. Metabolomic fingerprint of heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS One* 10, e0124844 (2015).
 - 24 Ruiz, M., Labarthe, F., Fortier, A., Bouchard, B., Thompson Legault, J., Bolduc, V., Rigal, O., Chen, J., Ducharme, A., Crawford, P. A., Tardif, J. C. & Des Rosiers, C. Circulating acylcarnitine profile in human heart failure: a surrogate of fatty acid metabolic dysregulation in mitochondria and beyond. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 313, H768-H781 (2017).
 - 25 Doehner, W., Frenneaux, M. & Anker, S. D. Metabolic impairment in heart failure: the myocardial and systemic perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 1388-1400 (2014).
 - 26 Zairis, M. N., Patsourakos, N. G., Tsiaousis, G. Z., Theodosis Georgilas, A., Melidonis, A., Makrygiannis, S. S., Velissaris, D., Batika, P. C., Argyrakis, K. S., Tzerefos, S. P., Prekates, A. A. & Foussas, S. G. Plasma asymmetric dimethylarginine and mortality in patients with acute decompensation of chronic heart failure. *Heart* 98, 860-864 (2012).
 - 27 Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 536-550 (2014).
 - 28 Alrob, O. A., Sankaralingam, S., Ma, C., Wagg, C. S., Fillmore, N., Jaswal, J. S., Sack, M. N., Lehner, R., Gupta, M. P., Michelakis, E. D., Padwal, R. S., Johnstone, D. E., Sharma, A. M. & Lopaschuk, G. D. Obesity-induced lysine acetylation increases cardiac fatty acid oxidation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc. Res.* 103, 485-497 (2014).
 - 29 Thapa, D., Zhang, M., Manning, J. R., Guimaraes, D. A., Stoner, M. W., O'Doherty, R. M., Shiva, S. & Scott, I. Acetylation of mitochondrial proteins by GCN5L1 promotes

- enhanced fatty acid oxidation in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 313, H265-274 (2017).
- 30 Mori, J., Alrob, O. A., Wagg, C. S., Harris, R. A., Lopaschuk, G. D. & Oudit, G. Y. ANG II causes insulin resistance and induces cardiac metabolic switch and inefficiency: a critical role of PDK4. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H1103-1113 (2013).
 - 31 Koentges, C., Pfeil, K., Schnick, T., Wiese, S., Dahlbock, R., Cimolai, M. C., Meyer-Steenbuck, M., Cenkerova, K., Hoffmann, M. M., Jaeger, C., Odening, K. E., Kammerer, B., Hein, L., Bode, C. & Bugger, H. SIRT3 deficiency impairs mitochondrial and contractile function in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 110, 36 (2015).
 - 32 Fukushima, A., Milner, K., Gupta, A. & Lopaschuk, G. D. Myocardial Energy Substrate Metabolism in Heart Failure : from Pathways to Therapeutic Targets. *Curr. Pharm. Des.* 21, 3654-3664 (2015).
 - 33 Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 207-258 (2010).
 - 34 Jing, E., Emanuelli, B., Hirschey, M. D., Boucher, J., Lee, K. Y., Lombard, D., Verdin, E. M. & Kahn, C. R. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 14608-14613 (2011).
 - 35 Drexler, H., Riede, U., Munzel, T., Konig, H., Funke, E. & Just, H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 85, 1751-1759 (1992).
 - 36 Overmyer, K. A., Evans, C. R., Qi, N. R., Minogue, C. E., Carson, J. J., Chermiside-Scabbo, C. J., Koch, L. G., Britton, S. L., Pagliarini, D. J., Coon, J. J. & Burant, C. F. Maximal oxidative capacity during exercise is associated with skeletal muscle fuel selection and dynamic changes in mitochondrial protein acetylation. *Cell Metab.* 21, 468-478 (2015).
 - 37 Venables, M. C., Achten, J. & Jeukendrup, A. E. Determinants of fat oxidation during exercise in healthy men and women: a cross-sectional study. *J. Appl. Physiol.* (1985) 98, 160-167 (2005).
 - 38 Fukushima, A., Alrob, O. A., Zhang, L., Wagg, C. S., Altamimi, T., Rawat, S., Rebeyka, I. M., Kantor, P. F. & Lopaschuk, G. D. Acetylation and succinylation contribute to maturational alterations in energy metabolism in the newborn heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 311, H347-363 (2016).
 - 39 Sankaralingam, S., Abo Alrob, O., Zhang, L., Jaswal, J. S., Wagg, C. S., Fukushima, A., Padwal, R. S., Johnstone, D. E., Sharma, A. M. & Lopaschuk, G. D. Lowering body

- weight in obese mice with diastolic heart failure improves cardiac insulin sensitivity and function: implications for the obesity paradox. *Diabetes* 64, 1643-1657 (2015).
- 40 Gao, S., McMillan, R. P., Jacas, J., Zhu, Q., Li, X., Kumar, G. K., Casals, N., Hegardt, F. G., Robbins, P. D., Lopaschuk, G. D., Hulver, M. W. & Butler, A. A. Regulation of substrate oxidation preferences in muscle by the peptide hormone adropin. *Diabetes* 63, 3242-3252 (2014).