

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390328

研究課題名(和文) 低体温導入及び復温に伴う心筋蛋白質リン酸化(脱リン酸)の網羅的プロテオミクス解析

研究課題名(英文) Phosphoproteomic analysis of cardiac proteins modulated by hypothermia and rewarming

研究代表者

織田 禎二(Oda, Teiji)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50448198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔下のラットに軽度(30℃)、高度低体温(23℃)を導入して心筋蛋白質リン酸化、心機能および自律神経機能の変化を解析し常温群(37℃)、復温群と比較した。心筋プロテオミクス解析により、317個のリン酸化ペプチドを同定し、このうち確度の高いリン酸化ペプチドは27個であった。これらはミオシン-6、-7など心収縮、クレアチンキナーゼなどエネルギー産生、ヒートショックプロテインなどシャペロンに関連していた。左室収縮能解析では心拍数の減少とともに心収縮能の亢進を認めたが、これはタンパク質リン酸化の変動と対応していた。同様の機序は低体温の保護作用についても予想され、今後の重要な研究課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hypothermia is utilized in cardiac/aortic surgery to protect organs from ischemic injury. Because of a short duration of hypothermia, it is important as for a principal mechanism of hypothermia to modulate protein phosphorylation rather than de novo protein synthesis. To analyze hypothermia-induced protein phosphorylation in rat heart muscle, we employed nanoLC-MALDI/TOF/TOF MS/MS tandem mass spectrometry. In total, 317 phosphopeptides were identified, in which 27 peptides were quantitatively identified with significant evidences. These were included in 11 proteins that regulate ATP synthesis, muscle contraction and protein folding. Mild (30℃) to deep hypothermia (23℃) augmented contractility of left ventricle; which were associated with phosphorylation of the cardiac myofilament proteins including myosin-6 and tropomyosin. Hypothermic modulation of protein phosphorylation could cause the hypothermic protection from ischemic injury, which needs to be investigated further.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：低体温 心筋 蛋白質 リン酸化 心機能 自律神経 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

低体温導入及び復温が生体を与える影響は多岐に渡り複雑であるが、その多くは未開である。低体温の副作用軽減や最適応用のためには、その影響の全体像を網羅的に把握することが重要である。我々は高度低体温により誘導される蛋白質発現変化について、動物および臨床サンプル(肝臓・心臓組織)を用いて、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF/TOF MS/MS)の組み合わせでプロテオミクス解析を行ってきた。心臓・大血管手術への低体温応用は短時間に限られるため、新規蛋白質合成よりもリン酸化など翻訳後修飾がより重要な機序として想定される。一方低体温導入による心機能変化とその機序についても一定の知見は得られておらず、自律神経の影響を論ずる研究もあるが、それらを統合した理解は得られていない。

2. 研究の目的

軽度(30℃)～超低体温(<20℃)導入(冷却)・復温による心筋蛋白質の発現変化をリン酸化も含め、最新のハイスループットなプロテオミクス手法により網羅的に解析し、同時に心機能・自律神経活動についても分析して自律神経・心機能・心筋蛋白質リン酸化の関連を低体温レベル、冷却・復温との関連で網羅的に解明して、副作用の少ない最適な低体温法の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) ラット表面冷却低体温導入及び復温による心筋の蛋白質発現変化およびリン酸化解析: ラットを全身麻酔・人工呼吸下に表面冷却により低体温を導入し、あるいはその後復温する。ラットを無処置群、常温群(37℃)、軽度低体温(30℃)、高度低体温(23℃)、高度低体温・復温の5群に分け実験を行い終了時に左室心筋を採取する。プロテオミクス解析は心筋組織よりタンパク質を抽出し処理後トリプシンにてペプチドに分解、iTRAQ 試薬で標識し、上記各群のサンプルを混合して陽イオン交換クロマトグラフィー、NanoLC クロマトグラフィーで分画し、MALDI-TOF/TOF 質量分析計で MS 分析を行い続いて MS/MS 分析を行う。リン酸化に重点を置いた解析のため、IMAC(immobilized metal affinity chromatography 法)などによりリン酸化 peptide を濃縮して効率的な解析を行う。リン酸化の解析には ProteinPilot software を用い、バイオインフォマティクス解析には Panther ソフトウェアなどを用いる。

(2) 低体温導入・復温による心機能変化の解析: ラットを全身麻酔・人工呼吸下に胸骨を正中切開して小動物用コンダクタンスカテーテルを左室心尖部より挿入し負荷条件に依存しない心収縮力の指標(Ees)にて心機能を計測する。常温維持群、30℃冷却維持群、

23℃冷却維持群、23℃冷却復温群の各群で心機能の変化を計測する。

(3) 低体温導入・復温による自律神経活動変動の解析: 上記の実験経過中の心電図波形を採取しフーリエ解析を用いてパワースペクトラル解析を行い冷却・復温による自律神経活動変化を分析する。

(4) ラット用人工心肺回路の開発と体外循環法の確立: 小動物用人工心肺回路のプロトタイプを企業より購入してラットにおいて体外循環を確立できるように細部を改良して超低体温(<20℃)を導入し心筋タンパク質の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 心筋タンパク質リン酸化の解析  
FDR(false discovery rate) <5%の基準を満たすリン酸化ペプチドを317個同定した。このうち、リン酸化について既にその位置情報(アミノ酸残基)が web (PhosphoSitePlus; <http://www.phosphosite.org/>)上で確認でき、かつデータが一致したのは103個のペプチドであった。さらに ProteinPilot software 上高い peptide confidence を有するか、そのアミノ酸残基のリン酸化を裏付ける文献を確認できたペプチドは27個であった(表1)。

遺伝子名	リン酸化部位	conf (%)	裏付け文献
MYH6	Ser172	<1	有り
	Sr196	<1	有り
	Ser622	<1	有り
	Ser626	<1	有り
	Ser880	99	有り
	Ser1711	<1	有り
S	Ser1723	88	無し
	Ser1777	<1	有り
TPM1	Ser283	99	有り
ACTC1	Ser241	99	有り
SLC25A4	Ser42	99	無し
CKM	Ser128	<1	有り
	Ser129	<1	有り
MYH7	Ser879	99	無し
	Ser1722	88	無し
UQCRC1	Ser212	<1	有り
	Ser221	<1	有り
ALDOA	Ser36	<1	有り
	Thr37	<1	有り
	Ser39	<1	有り
HSPB1	Arg38	<1	有り
	Ser86	<1	有り
	Ser87	<1	有り
HSP90AB1	Ser452	<1	有り
ACTG1	Ser14	<1	有り
	Ser33	<1	有り
	Ser239	<1	有り

表1: ラット心筋タンパク質リン酸化ペプチド

これらの高い信頼性を有するリン酸化ペプチドは、myosin-6 (MYH6), tropomyosin alpha-1 (TPM1), myosin-7 (MYH7)などの心筋収縮タンパク、 creatine kinase M-type (CKM), Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA), Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (UQCRC1)などのエネルギー産生に関連するタンパク質、Heat shock protein beta-1(HSPB1), Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)などの chaperon であった。このうち、心筋収縮タンパク質では、リン酸化ペプチドの冷却・復温経過中の変化は高度低体温導入によりリン酸化が抑制されるか (MYH6、図1)、あるいは逆に促進した (TPM1、図2)。TPM1 のリン酸化の促進は心筋繊維の収縮力を増やすことが知られており (Yuan C, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295:H647-H656;2008; Vahebi S, et al. Circ Res 100:408-415;2007)、これは後述する低体温での左心収縮力増強と関連すると考えられた。

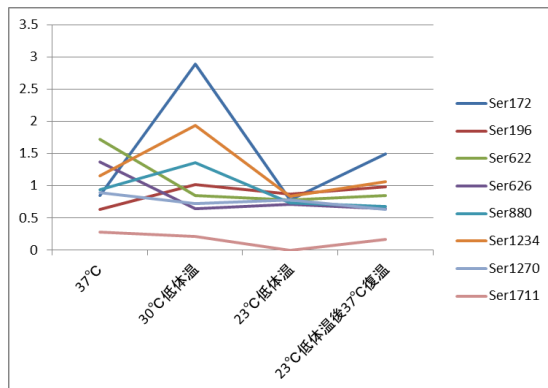


図1 : myosin-6 : リン酸化ペプチドの変動

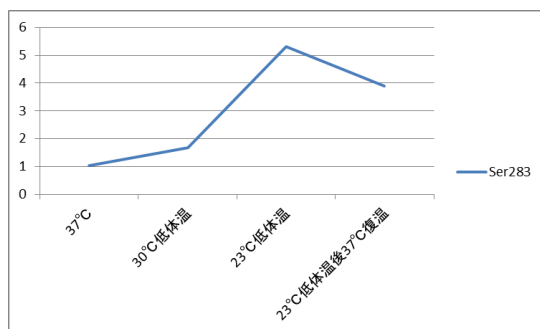


図2 : tropomyosin alpha-1 : リン酸化ペプチドの変動

心筋のエネルギー代謝に関しては、低体温導入により creatine kinase M-type (CKM) の serine128 リン酸化ペプチドが増加した。これはCKM の reverse reaction (Phosphocreatine + ADP → creatine + ATP)を抑制するものである。CKM は PKC によりリン酸化されるが、その調節は細胞内の ATP/AMP 比などにより調節されており (Lin G, et al. Cell Mol Life Sci 66:135-144;20099)、低体温によりエネルギーを貯蔵する方向に調節されていると推定される。Chaperon 蛋白質リン酸化に関するこれ

までの研究によると、Heat shock protein beta-1(HSP27)のリン酸化抑制により、心臓手術後の心機能が改善するとする報告がある (Clements RT, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 300:H1669-H1677;2011)。本研究とはリン酸化の位置 (アミノ酸残基) が違うため、関連を類推することはできないが、今後も検討すべき重要な chaperon タンパク質である。

### (2) 心機能変化の解析

低体温導入・復温に伴う左心収縮能変化について、コンダクタンスカテテルを用いて計測した Ees で代表して示すと図3の如く常温維持群と比較して、軽度低体温 (30 ) で心収縮能が亢進することが分かった。これは前述した TPM1 のリン酸化などによる心筋収縮増強作用によるものと考えられた。

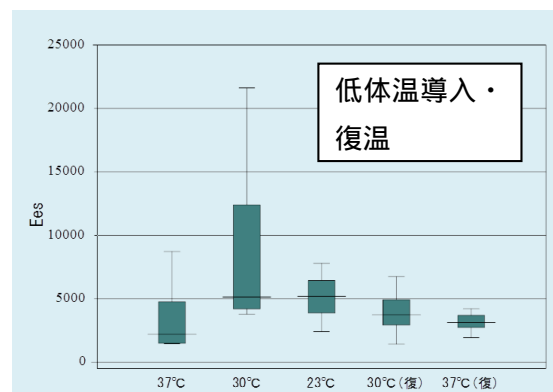
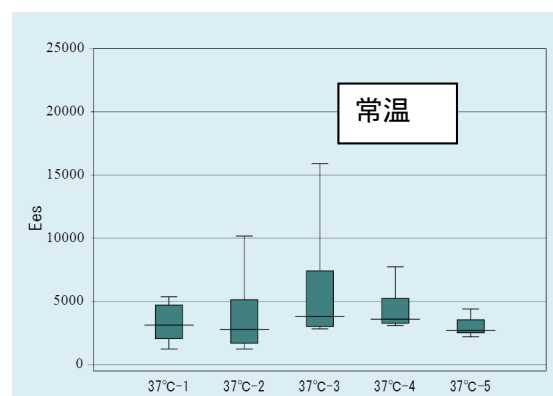


図3 : 常温群、高度低体温・復温群での心機能変化

### (3) 自律神経活動変動の解析

経過中の心拍変動について周波数解析を行った。冷却に伴う体温の低下により心拍数が著明に減少し、復温により再上昇した。その心拍数変動に対応する時間経過で HF (高周波成分; 0.16-0.40Hz)が増加し、その後減少した。心拍数の変動が大きいため、その意義の解釈は難しいが、副交感神経の活性化と抑制を示すものと考えられた (図4)。また心臓自律神経のバランスの指標とされる LH/HF は低体温中相対的に抑制されており、これは軽度低体温により交感神経が抑制されるとする従来の報告と (Schwarzl M, et al. Acta

Physiol 2011)、合致する。このような自律神経活動の変化と心筋タンパク質リン酸化および心機能との関連を探る研究は今後の課題である。

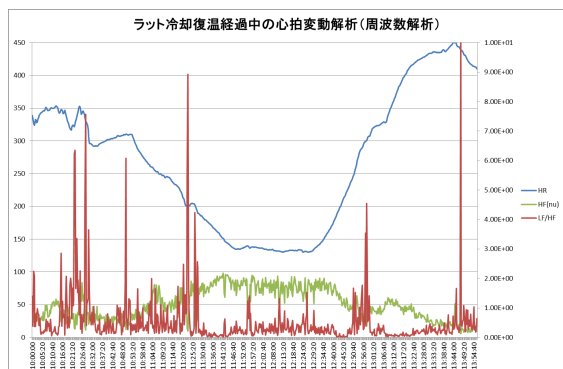


図 4：ラット冷却復温中の心拍変動解析

#### (4) ラット用人工心肺回路の開発と体外循環法の確立

企業製の小動物用人工肺および人工心肺回路を用いてラットに体外循環を確立する実験を行ったが、十分な性能がなくそれに対する企業側の対応も不十分であったため、他の企業との共同研究に切り替えて研究を継続している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kazumi Satoh, Kazuo Yamada, Tomoko Maniwa, Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto, Monitoring of serial presurgical and postsurgical changes in the serum proteome in a series of patients with calcific aortic stenosis, Disease Markers, 査読有, Volume 2015, Article ID 694120, 11pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/694120>

Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto, Proteomic analysis in cardiovascular research, Surgery Today, 査読有 DOI:10.1007/s00595-015-1169-4

Yoshifumi Fujimoto, Shoichi Suehiro, Hiromi Wada, Teiji Oda, Senning operation for very low birth weight infant with transposition of the great arteries: one of the smallest cases in the world, General Thoracic and Cardiovascular Surgery, 査読有, DOI: 10.1007/s11748-014-0496-5

Teiji Oda, Akane Yamaguchi, Masao Yokoyama, Koji Shimizu, Kosaku Toyota, Tetsuro Nikai, Ken-ichi Matsumoto, Plasma proteomic changes during hypothermic and normothermic cardiopulmonary bypass in aortic surgeries, Int J Mol Med 査読有 34:947-956,2014, DOI:

[10.3892/ijmm.2014.1855](http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1855)

Ken-ichi Matsumoto, Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Tetsuya Tanaka, Hideki Okunishi, Teiji Oda, Proteomic comparison between abdominal and thoracic aortic aneurysms, Int J Mol Med, 査読有, 33:1035-1047;2014, DOI:

[10.3892/ijmm.2014.1627](http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1627)

Hiroto Sato, Hiroyuki Yoshitomi, Tomoko Adachi, Nobuhide Watanabe, Saki Ito, Takashi Sugamori, Akihiro Endo, Nobuyuki Takahashi, Teiji Oda, Kazuaki Tanabe, A case with myxoma of the left ventricular outflow tract, Journal of Cardiology cases, 査読有, 10:13-15;2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jccase.2014.03.002>

Kazumi Satoh, Tomoko Maniwa, Teiji Oda, Ken-ichi Matsumoto, Proteomic profiling for the identification of serum diagnostic biomarkers for abdominal and thoracic aortic aneurysms, Proteome Sci, 査読有, 11,articles27, 13 pages,2013, DOI: [10.1186/1477-5956-11-27](http://www.proteomesci.com/content/11/1/27)

Masao Yokoyama, Kouji Shimizu, Shoichi Suehiro, Tomoki Hanada, Teiji Oda, Graft selection for the right coronary artery region: saphenous vein and gastroepiploic artery grafts, J Jpn Coron Assoc, 査読有, 19:114-117;2013, DOI: [10.7793/jcoron.19.515](http://dx.doi.org/10.7793/jcoron.19.515)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

織田 禎二(ODA TEIJI)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号:50448198

##### (2) 研究分担者

松本 健一 (MATSUMOTO KENICHI)  
島根大学・総合科学研究支援センター・教授  
研究者番号：30202328

##### (3) 研究分担者

清水 弘治 (SHIMIZU KOJI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：70548578

##### (4) 研究分担者

末廣 章一 (SUEHIRO SHOICHI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：90596545