

氏名(本籍)	道家 智博(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第516号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位論文題目	Proteomic Analysis Reveals Significant Alternations of Cardiac Small Heat Shock Protein Expression in Congestive Heart Failure (プロテオーム解析は不全心筋におけるSmall Heat Shock Proteinの著しい変化を明らかにした)
審査委員	主査 教授 大久保 岩男 副査 教授 三ツ浪 健一 副査 教授 服部 隆則

論文内容要旨

※整理番号	521	(ふりがな) 氏名	どうけ ともひろ 道家 智博
学位論文題目	Proteomic Analysis Reveals Significant Alterations of Cardiac Small Heat Shock Protein Expression in Congestive Heart Failure (プロテオーム解析は不全心筋における Small Heat Shock Protein の著しい変化を明らかにした)		
<p>[背景と目的] 心不全の病態形成の原因は多因子であり、単一遺伝子や分子で形成されることはないため、不全心での多数のタンパク質発現の変化を系統的に解析することがその病態解明において重要となる。プロテオームとは細胞内の全タンパク質を意味し、遺伝情報に基づいて作られるタンパク質は細胞内で翻訳後、付加や切断などの修飾を受けて機能する。プロテオーム解析とは病態で実際に発現、機能しているタンパク質の全体像をとらえる解析法である。我々はプロテオーム解析を用いて心筋でのタンパク質の系統的発現変化を二次元電気泳動法(2-DE)で展開し、心不全に特異的なタンパク質変化の検索と解析を行い、心不全の病態解明を研究の目的とした。</p> <p>[方法] ビーグルイヌに開胸下でペーシングリードを右室心尖部に植え込み、高頻度ペーシング(240bpm 4週間)にて心不全イヌを作製した。正常群(n=6)と心不全群(n=6)の心筋を2-DEに展開した後、銀染色し、タンパク質スポットの系統的発現の変化をPDQUEST(Ver. 7.3)を用いたデジタル解析により比較検討した。心不全群で特異的に変化したタンパク質をmatrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer(MALDI-TOF MS)にて同定した。同定したタンパク質は2-DEを用いたウエスタンブロット法で確認し、1次元電気泳動法を用いたウエスタンブロット法で定量した。更に燐酸化が翻訳後修飾の一つとして重要であるため、燐酸化タンパク質染色法(Pro-Q Diamond法)とウエスタンブロット法にて燐酸化の評価をした。</p> <p>[結果] 2-DEでは約500個のスポットを認め、心不全では20スポット(増加が14、減少が6)が有意に変化していた。その中で変化の著しい9スポット(増加が6、減少が3)をMALDI-TOF/MSにて同定した。心不全群で増加していたタンパク質はAlpha B crystallin、Heat shock protein(HSP)27、HSP20、Haptoglobin alpha and beta chainと同定でき、一方減少していたタンパク質はMyoglobin、Fatty acid binding protein(FABP) Tropomyosin alpha chainと同定できた。増加していたうちの5つのスポットはいずれも心筋の形態または機能の維持と様々なストレスの耐性に関与しているsmall HSPに属するタンパク質であり、これらに焦点を当て更なる解析を行った。当初1つと思えたAlpha B</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

crystallin は 2-DE のウエスタンブロット法で 2 スポットあることがわかった。磷酸化タンパク質染色法によりひとつが磷酸化フォーム、他方が非磷酸化フォームであり、特に Serine (Ser)-59 の磷酸化フォームが 3 倍増加していた。HSP27 では 2-DE のウエスタンブロット法で 3 つのスポットを認めた。いずれのスポットも磷酸化フォームであり、磷酸基がそれぞれ 3 個、2 個、1 個結合したものであった。Ser-78、Ser-82 の磷酸化フォームが各々 2.7 倍、1.7 倍上昇していた。HSP20 では 2-DE のウエスタンブロット法で 2 つのスポットを認め、磷酸化フォームと非磷酸化フォームであり、いずれのフォームも心不全で上昇していた。定量では正常群と比較し心不全群で 4.5 倍上昇していた。

[考察] 我々はプロテオーム解析の手法を用いて心不全で特異的に変化する 9 タンパク質スポットを同定した。発現が減少していた 3 スポットは Myoglobin、FABP、Tropomyosin alpha chain であった。Myoglobin は心筋の酸素輸送に関与したタンパク質、FABP はミトコンドリアのエネルギー産生系に関与したタンパク質、Tropomyosin alpha chain は心筋骨格に関連したタンパク質である。これらのタンパク質の減少は心不全での心筋細胞のエネルギー産生系の低下や骨格構造の破壊を反映していたと考えられた。一方、発現が増加していたタンパク質は Alpha B crystallin、HSP27、HSP20 であり small HSP に属する。HSP はタンパク質のフォールディングや輸送、細胞骨格の維持作用など様々な機能を有しており、特に small HSP は分子量 15~40kDa の C 末端に Alpha crystallin ドメインを有するタンパク質を言う。Alpha B crystallin、HSP27 は虚血再還流モデルで心筋細胞の形態または機能の維持と様々なストレスの耐性に関与しているとの報告がある。HSP20 は今回の研究で初めて心不全でもっとも変化の著しい small HSP であることが明らかになった。最近 HSP20 の過剰発現ラット心筋細胞においてアポトーシスを抑制したとの報告があり、これら 3 つの small HSP の増加は心筋保護的に作用し、心不全の病態形成に代償的に働いていると考えられた。翻訳後修飾の一つである磷酸化はタンパク質の機能の活性化に重要である。Alpha B crystallin は Ser-59 の磷酸化フォームが増加していることが明らかとなった。実際、磷酸化 Alpha B crystallin は心筋細胞の虚血ストレスに対して抗アポトーシス作用を示し、Ser-59 の磷酸化が必須であるとの報告がある。心不全においても Alpha B crystallin の Ser-59 の磷酸化が重要であると考えられた。HSP27 は磷酸化によりアクチンフィラメントの安定に寄与しているとの報告がある。今回 HSP27 は Ser-78、Ser-82 の磷酸化フォームが増加、また過磷酸化が明らかとなり、これらも心不全の病態に重要な変化であると考えられた。さらに HSP20 は磷酸化し心筋細胞において細胞内カルシウム濃度を上昇させ収縮能を増加させるとの報告があり、心不全の病態において HSP20 は磷酸化により活性化し収縮能の改善に寄与している可能性がある。以上より心不全において small HSP とその磷酸化は心筋の傷害やストレスに対して保護的に働くタンパク質として発現が亢進している事が我々の結果から推察できた。

[結論] プロテオーム解析は心不全病態の分子機構を明らかにする新しい手法であり、我々が見いだした small HSP とその磷酸化は心不全の診断や治療の新たなターゲットとなり得る可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	521	氏名	道家 智博
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>心不全の病態形成の原因を解明するため、頻拍誘発性心不全イヌモデルを作製し、正常心と不全心の左室でのタンパク質の発現を 2 Dimensional Electrophoresis、MALDI-TOF/MS でプロテオーム解析を行った。2-DE では約 500 個のスポットを認め、心不全で変化のあった 9 スポット (増加が 6、減少が 3) を同定した。心不全群で増加していたタンパク質は Alpha B crystallin、Heat shock protein(HSP)27、HSP20、Haptoglobin alpha and beta chain と同定でき、一方減少していたタンパク質は Myoglobin、Fatty acid binding protein(FABP) Tropomyosin alpha chain と同定できた。増加していたうちの 5 つのスポットはいずれも small HSP に属するタンパク質であり、翻訳後修飾としてリン酸化の評価をしたところ alpha B crystallin では Serine(Ser)-59 が、HSP27 では Ser-78 と Ser-82 が増加していた。Small HSP はリン酸化して活性化し心保護的に働くことが報告されており、心不全における small HSP の増加とそのリン酸化は心不全に対して代償的に働いていると考えられた。プロテオーム解析は心不全病態の分子機構を明らかにする新しい手法であり、本研究は small HSP とそのリン酸化が心不全の診断や治療の新たなターゲットとなり得る可能性を見いだした。よって、博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p>			
(平成 18 年 2 月 3 日)			