

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700704

研究課題名(和文) 継続的運動は感染症モデルラットの炎症惹起に伴う臓器のニトロ化傷害を軽減するか？

研究課題名(英文) Does long-term exercise reduce the nitration of organs caused by inflammation in rat infection model?

研究代表者

池田 啓一 (IKEDA, Keiichi)

北陸大学・薬学部・講師

研究者番号：90453597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：感染に伴う臓器障害の予防に対する自発的運動の寄与について、ニトロ化タンパク質や酸化ストレスマーカーの消長から知ること为目标とし、研究を進めている。今回は、感染および運動における知見を得ることが出来た。リポ多糖投与による感染モデルにおいては、リポ多糖の投与量によるニトロ化や酸化ストレスマーカーの応答の強さと時間変化の消長について、臓器ごとに違いがあることがわかった。また、運動については、適度な運動をしていないマウスについては、Mn-スーパーオキシドジスムターゼの発現量が多く、これは、体重当たりの酸素消費量が多いことに起因するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aim of the research is to know contribution of long-term spontaneous movements for the prevention of organ damage caused by the infection. In this research, it was able to obtain the knowledge in infection model animals and exercise model animals. In the infection model with lipopolysaccharide administration, the fate of the intensity and time variation of the response of nitrating and oxidative stress markers with the dose of lipopolysaccharide are different for each organ. The mice that do not have a moderate exercise, highly expression level of Mn- superoxide dismutase and large amount of oxygen consumption per body weight were observed.

研究分野：環境健康学

キーワード：タンパク質ニトロ化

## 1. 研究開始当初の背景

感染症について、開発途上国においては水系感染症を始めとする問題が残っている。先進国においては、あらゆる生活環境における衛生状態の改善など感染症対策は充分に行われてきているが、新たな問題として、新興・再興感染症や、高齢者など体力の弱い人が感染しやすいMRSAなどの多剤耐性菌による感染症が挙げられる。それらへの対策として、免疫機能を強化し感染予防すること、感染症状の治療法を見いだすことが重要である。特に免疫機能に関しては、生化学的アプローチによって、感染に伴う臓器障害とその復帰に関する分子メカニズムを解明することが必須である。感染時においては、細菌内毒素であるリポ多糖(LPS)がマクロファージ細胞膜上に存在するToll-like Receptor 4 (TLR4)と結合し、MyD88 依存性シグナル経路などを介し、一酸化窒素(NO)やスーパーオキシド( $O_2^-$ )の発生を促し、ニトロ化などの酸化傷害を引き起こす。ニトロ化は、生体内では生理的条件下や、炎症や虚血-再還流の際に発生するNOと $O_2^-$ に由来するパーオキシナイトライト(ONOO-)や $NO_2$ といった活性窒素種のタンパク質、脂質、ヌクレオチドに対する反応である。活性窒素種の過剰な発生は、各組織にニトロ化による酸化傷害を起こす。タンパク質中のニトロチロシンは、炎症性疾患、脳神経系疾患、がんなどの疾患部位において検出されている。我々は、活性窒素種による新規ニトロ化アミノ酸残基として、6-ニトロトリプトファンを見いだした。さらに、6-ニトロトリプトファンの抗体を開発し、プロテオーム解析でトリプトファンニトロ化タンパク質を同定し、トリプトファンのニトロ化が分子間相互作用に何らかの影響を与えると予想した。我々は、トリプトファンニトロ化の生体中での役割を知るために、強毒性の感染モデルとして、ラットの腹腔にLPSを投与し、敗血症モデルラットを作成している。更に臓

器中のタンパク質のトリプトファン残基がニトロ化されるが、一定時間が過ぎると、ニトロ化が消失することも6-ニトロトリプトファン特異抗体を用いて見いだしている(未発表)。このことから、トリプトファンのニトロ化がシグナル伝達などのタンパク質機能制御に関わっている可能性があり、消長が見られたニトロ化タンパク質の同定およびその修飾部位の決定により、感染防御のメカニズムの解明へつながることが期待できる。

## 2. 研究の目的

感染は、酸化傷害を生体に及ぼすが、その一つに生体物質へのニトロ化ストレスが知られている。身体運動による体力の増加は、感染症予防および感染症による臓器障害の軽減に有効であるとされているが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では、我々が独自に開発した抗ニトロ化タンパク質抗体を用い、プロテオーム解析や生化学的手法により、運動群と非運動群とで感染に伴うニトロ化タンパク質の消長がどのように変化するか検討する。これらの結果、運動が感染時に酸化傷害を防ぐ仕組みを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ラットに対し敗血症を起こさせるリポ多糖を投与し、その投与量とラットの感受性について、酸化・ニトロ化ストレス関連タンパク質を指標に行った。

(2) 40週齢まで自発運動をしたマウス、自発運動をしたものの途中で運動しない期間を挟むマウス、全く自発運動をしないマウスについて、その代謝および酸化・ニトロ化ストレス関連タンパク質の変化を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 腎臓において、誘導型一酸化窒素合成酵素の発現誘導に投与量による差異は見られず、一過性に発現量の増加が見られた後、

時間を追うごとに低下する傾向が見られた。Mn-スーパーオキシドジスムターゼの誘導については、量依存的増加と時間依存的な増加が見られた。トリプトファンニトロ化による修飾について、筋肉と腎臓を比較したところ、腎臓では一過性に修飾の度合いが増加した後には下がる傾向が見られたが、筋肉においては、時間依存的に増加することから、臓器によるレスポンスの違いがあることがわかった。他のマーカーについても

(2) マウスの自発的運動に伴う、代謝指標について調べたところ、体重あたりの酸素消費量 ( $VO_2pw/mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ) が、全く自発運動を行っていない場合に多く、自発運動群では有意に少ないことがわかった。酸化ストレス指標についても調べたところ、老化や運動によって、誘導型一酸化窒素合成酵素の誘導が行われていないことが確認された。ニトロ化については、運動期間が長くなるに伴い増えている傾向にあったが、全体的なニトロ化の度合いが少ないことが確認された。Mn-スーパーオキシドジスムターゼの発現については、全く自発運動をしていないマウスに多かった。これは、適度な運動をしていないマウスに比べ、体重あたりの酸素消費量が多かったことに起因するものと考えられる。

## 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4件)

1. Naoki Shida, Yoko Tsuchiya, Fumiyouki Yamakura, Tatsuji Kano, Yuji Nakazato, Kazuko Takada, Sachio Kawai, Keiichi Ikeda, Yuko Amamiya, Shigeru Nakajima, Kazuhiko Machida, Hideaki Iwai, A Nutrition Survey of Atherosclerosis Patients to Study the Effects of Iron, Zinc, and Copper on Atherosclerosis, Trace Nutrients Research, 29, 110 - 116, 2012

2. Jun Kobayashi, Masakatsu Nohara, Keiichi Ikeda, Mariko Mochizuki, Hiromi Amao, Determination of the G+C Content of Genomic DNA by Reversed Phase HPLC, Jpn. J. Health Fitness Nutr., 17(1), 19-24, 2012

3. 小林淳, 池田啓一, 寺田宙, 望月真理子, キレート樹脂を用いた環境水中微量ビスマスイオンの前濃縮法の基礎的検討、日獣生大研報 62, 76-81, 2013.

4. 小林淳, 池田啓一, 望月真理子, 杉山英男, HPLC を用いた微分スペクトルクロマトグラフ法の基礎的検討～機器附属ソフトを計算に利用した実試料からのカフェイン回収～、日獣生大研報 62, 82-88, 2013.

[学会発表](計15件)

1. 伊藤匠、水野拓也、平岡博子、奈良岡佑南、三澤義知、又平芳春、池田啓一、細見修、イヌの悪性がん細胞に対する  $GlcNH_2$  と  $Gal$  1-6 $GlcNH_2$  ( $MeINH_2$ ) の増殖抑制効果について、第26回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集、平成24年7月(キチン・キトサン研究 18(2), 215, 2012)

2. 細見修、奈良岡佑南、池田啓一、伊藤匠、ヒト由来 K562 白血病細胞の  $Gal$  1-6 $GlcNH_2$  ( $MeINH_2$ ) 受容体と取り込み経路について、第26回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集、平成24年7月(キチン・キトサン研究、18(2), 215, 2012)

3. 小林淳、池田啓一、寺田宙、望月真理子、杉山英男、フォトダイオードアレイ検出高速液体クロマトグラフィーによる環境水および尿中カフェインの迅速分析、平成24年9月、日本分析化学会第61年会講演要旨集、p.253

4. 小林淳, 池田啓一, 望月真理子, 寺田宙, 逆相 HPLC を用いた DNA の GC 含量測定法、第2回動物保健看護系大学協会学術発表会(2013年3月, 東京)

5. 石田美保, 藤掛有紀子, 小林淳, 池田啓二, 杉山英男、ペットフード中の亜硝酸の測定、第 2 回動物保健看護系大学協会学術発表会 (2013 年 3 月, 東京)
6. 小林淳, 藤掛有紀子, 石田美保, 池田啓二, 寺田宙, 杉山英男、ペットフード間の亜硝酸濃度の違い、日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月, 神奈川)
7. 小林淳, 池田啓一, 寺田宙, 望月眞理子, 杉山英男、PDA 検出 HPLC を用いた微分スペクトルクロマトグラフ法によるバックグラウンドノイズの消去、第 73 回分析化学討論会 (2013 年 5 月, 北海道)
8. 小林淳, 石田美保, 藤掛有紀子, 池田啓一、杉山英男、ペットフード中の亜硝酸の測定、第 30 回イオンクロマトグラフィー討論会 (2013 年 11 月、愛知)
9. 小林淳、池田啓一、寺田宙、望月眞理子、杉山英男、微分スペクトルクロマトグラフ法による実試料中カフェインの定量改善の可能性、日本分析化学会第 62 年会講演要旨集、(p. 347, 2013 年 9 月、大阪)
10. 池田啓一、松本孝、川崎広明、松本綾子、細見修、小林淳、佐々木啓、山倉文幸、ペルオキシナイトライトによる卵白リゾチームのトリプトファンニトロ化は、tri-N-acetylchitotriose により阻害されるか? 第 35 回日本トリプトファン研究会学術集会 (2013 年 9 月、京都)
11. 小林淳, 藤掛有紀子, 石田美保, 西ひとみ, 池田啓一, 寺田宙, 杉山英男、犬猫用ペットフード中亜硝酸の測定、日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月, 熊本)
12. 小林淳、池田啓一、寺田宙、杉山英男、ICP-MS によるペットフード中金属の一斉分析、日本分析化学会第 74 年会(2014.9.17-19、広島)
13. 川崎広明、馬場猛、松本綾子、飯泉恭一、池田啓一、高森建二、山倉文幸、2 型糖尿病モデルマウスにおける 6-ニトロトリブ

トファンの生体内生成、第 36 回日本トリプトファン研究会学術大会 (2014.10.17-18、旭川)

14. 池田啓一、伊藤匠、菅波盛雄、廣瀬伸良、久保田尚子、佐賀典生、小林淳、山倉文幸、細見修、大学生柔道選手の健康管理について、日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸)

15. 小林淳、小林茉由奈、池田啓一、杉山英男、食品抽出液中での亜硝酸の安定性向上  
日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

池田啓一 (IKEDA, Keiichi)

北陸大学・薬学部・講師

研究者番号 : 90453597