

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21500695

研究課題名（和文）高血圧に伴う酸化・ニトロ化傷害への長期運動効果の分子機構をモデルラットで解明する

研究課題名（英文）Elucidation of a molecular mechanism of the effect of exercise training on oxidative and nitrative injury caused by hypertension in hypertensive-model rats.

研究代表者

山倉 文幸（YAMAKURA FUMIYUKI）

順天堂大学・医療看護学部・教授

研究者番号：20053358

研究成果の概要（和文）：高血圧症は脳卒中や心筋梗塞などの循環器系疾患を引き起こす要因として重要視されている。高血圧発症の機構には酸化傷害が関わっている事が知られている。我々は、高血圧への運動量療法の基盤を明らかにすることを目的とし、高血圧モデルラットを用いて、運動トレーニングがラットの組織の高血圧による酸化傷害へ及ぼす効果を明らかにした。また、新たな酸化傷害のマーカーとして6-ニトロトリプトファンを開発し、高血圧モデルラットでの運動効果解析への応用に成功した。

研究成果の概要（英文）：Hypertension is recognized as an important factor to cause cardiovascular diseases, such as myocardial infarction and stroke. Oxidative stress is known to participate for development of the hypertension. We revealed the effect of exercise training for the oxidative damage on the tissues of hypertensive model rat caused by hypertension, in order to clarify the bases of exercise therapy for hypertension. We have developed a new marker for oxidative stress, which is 6-nitrotryptophan, and established the method to apply this marker for the analysis of exercise effect on the hypertensive model rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：高血圧、酸化傷害、ニトロ化ストレス、自然発症高血圧ラット、運動、ニトロトリプトファン、海馬、

1. 研究開始当初の背景

(1)高血圧と酸化ストレス：種々のヒトおよび高血圧モデルラットの実験で、活性酸素種

(ROS)の増加が高血圧の発症進展に関与している事が判明している。そのメカニズムに関しレニン-アンジオテンシン-アルドステロン

系によるスーパーオキシド(O₂)産生促進、一酸化窒素の減少が提案されている。また、酸化傷害のマーカーとしての、タンパク質、脂質、核酸の活性酸素種による酸化生成物が、高血圧モデルラットで上昇している事が知られている。近年、もう一つの主要な酸化修飾物質として活性酸素種が注目されてきた。それに由来する修飾産物である3-ニトロチロシン(3-NT)含有タンパク質が多く疾患部位で見いだされているが、高血圧との関連の報告は無い。

(2)運動と酸化ストレス：一過性の高強度の運動時は酸化傷害を発生するが、適度な運動を継続する運動トレーニングでは酸化ストレス耐性が増大することを多くの研究が支持しているが、その詳しい機構は明らかにされていない。

(3)高血圧と運動トレーニング：軽症高血圧患者に於いて習慣的な有酸素運動が血圧の降下および高血圧に伴う心血管系疾患の危険因子の減少に効果が有ることが種々の疫学調査や研究で明らかとなっているが、その仕組みに関してはまだ良く解明されていない。一方、高血圧モデル動物を用いた運動トレーニング効果に関しては、SHRで高血圧発症前の長期自発運動が血圧上昇を抑制する事が知られている。その機序として、運動に伴い血管系での一酸化窒素の供給量の増加などが報告されている。

我々は、SHRの高血圧発症前の長期自発運動で、大動脈および心臓においてO₂分解酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性が上昇する事を報告した[1]。この事は、高血圧抑制の仕組みとしての、O₂の定常濃度の低下、一酸化窒素のO₂による消去の抑制、一酸化窒素の有効濃度の増加という機構を支持していた。これらの成果を高血圧の運動療法のモデルに適用すべく、SHRを用い高血圧発症後の長期運動の効果を調べた。現在までの結果として、高血圧の持続でSHR

心臓のミトコンドリアに3-NTが増大するが、同じ期間の自発運動により同部位のMn-SODが上昇し、代償的に3-NTが減少する事を見いだしている[2]。([1] Kohno H. et al. *Jpn Heart J*, 2002;43:25-34.[2]古川等、*順天堂医学*,2008, 54; 308-317.) 本研究は、それらの結果を踏まえて計画された。

2. 研究の目的

本研究では、総合的に高血圧に伴う酸化・ニトロ化ストレスとその運動による抑制の機構を解明するために、以前の研究では取り上げなかった酸化傷害関連酵素類の変動に測定項目を広げる。また対象としては、血漿や大動脈血管のみならず、大脳や運動により神経細胞の増殖が認められている海馬や運動との関わりが深い小脳、また、運動の影響を直接受ける筋肉を用い解析する。さらに、我々が独自に見いだした新しいニトロ化傷害マーカーである、6-ニトロトリプトファン(6-NO₂Trp)に対する抗体も用い[3][4]、新たなニトロ化傷害部位の検討も同時に行う。これは、既存のニトロチロシンのみでは、タンパク質の酸化傷害部位の全体を明にするには不足なためである。さらに酸化傷害の変動が顕著に見いだされたマーカーについて、我々に実績のある[4]プロテオミクス解析により、標的タンパク質を明らかにする。これらの結果を通し、高血圧に伴う障害に及ぼす自発運動トレーニングの効果の全体像を酸化・ニトロ化ストレスの次元で明らかにする事が目的である。[1] Kohno H. et al. *Jpn Heart J*, 2002; 43: 25-34. [2]古川等、*順天堂医学*,2008, 54; 308-317. [3] Yamakura F et al. *J Biochem* 2005; 38:57-69. [4] Ikeda K, et al. *Nitric Oxide* 2007;16,18-28

3. 研究の方法

(1) 15週齢のオスSHRを非運動群、および10週間の自発走トレーニング群に分けた。5

および15週齢SHRを高血圧発症前、直後のコントロールとした。非トレーニングコントロールは、トレッドミル上に放置した。各SHR群から速やかに大動脈血管と脳を摘出し、細胞を分画後、酸化傷害マーカーとして、脂質については4-ヒドロキシノネナール(HNE)、そしてタンパク質については3-ニトロチロシンを時間分解蛍光イムノアッセイ法で定量し、抗酸化酵素類はウエスタンブロット法で定量した。

(2) 我々が見いだした新規酸化傷害マーカーである、6-NO₂Trp含有タンパク質の測定をラットの運動に応用する手法を確立するために以下の実験を行う。12ヶ月齢F344ラットを用い(a)急性運動：15m/minの速度で1時間のトレッドミル走 (b) 運動トレーニング：同運動を4週間行う、の二通りの負荷を与え、その後海馬、小脳、足底筋、ヒラメ筋を採取してタンパク質を抽出する。対照群はトレッドミル上に放置する。

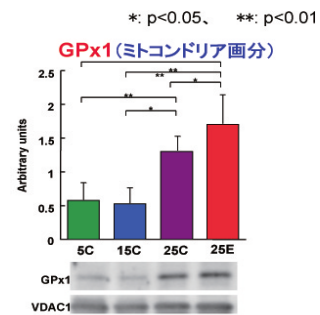
6-NO₂Trp含有タンパク質は2次元電気泳動及び抗6-NO₂Trp抗体を用いたウエスタンブロットティング(WB)を行い、抗体に陽性のスポットをトリプシン消化後LC-ESI-MS/MS解析を行って、タンパク質の同定とニトロ化部位の決定を試みる。

4. 研究成果

(1)平成21年度

SHR 大脳の高血圧発症時(15 週齢) とそれから 10 週の運動トレーニングの効果を見た。(1) 大脳の可溶性(S)画分での HNE 量は運動群で減少した。ミトコンドリア(Mit)画分では 25 週齢非運動群の HNE が上昇したが、運動はその上昇を抑制する傾向を示した。(2) 25 週齢においては、活性酸素発生系酵素の NADPH oxidase やキサンチンオキシダーゼ量が増加したが、運動による変化はなかった。抗酸化酵素では、S 画分と Mit 画分のグルタチオンペルオキシ

ダーゼ(GPx)が 25 週齢で有意に増加し、Mit では運動トレーニング群での更なる増加が見られた。以上の結果から、SHR の 10 週間の高血圧持続は大脳での活性酸素発生を増加させる。しかし、同時に抗酸化酵素一種(GPx)の量も増加する。運動はその抗酸化酵素の更なる増加を生じさせ、その結果酸化生成物である HNE の生成が軽減したと考えられる。



(2)平成22年

平成21年度と同様な系で、大動脈について解析した。HNE 量と 3-ニトロチロシンは運動群で有意に下がっていた。Mn-SOD のタンパク質量は、運動群のミトコンドリアで有意に高かった。従って、大動脈においては、活性酸素の発生源であるミトコンドリアでその分解酵素量を運動で増加させて活性酸素をより多く消去するので、酸化傷害が軽減されているとの結果であった(発表論文6)。更に、我々が見いだした新規酸化傷害マーカー、6-NO₂Trp の検出法を、培養細胞およびラットの組織抽出物へ適用し、始めて生体試料からの検出に成功した(発表論文2, 3)。

(3)平成23年度

対照群ラットの海馬から多くの抗 6-NO₂Trp 抗体陽性スポットが検出された。これらのスポットの中から解糖系の酵素などを含む 12 個のタンパク質を 6-NO₂Trp 含有タンパク質として確認し、生体内の生理的過程においても既に 6-NO₂Trp 含有タンパク質が存在することを初めて明らかにした(表1)。次に急性運動の影響を見たところ、海馬の 6-NO₂Trp 含有タンパク質を増加させる傾向を示した

が、その種類には大きな変化は無かった。運動トレーニングによっても 6-NO₂Trp 含有タンパク質は量的には増加する傾向があった。この結果は、我々の見出したタンパク質中のトリプトファン残基のニトロ化修飾は傷害マーカーではなく、生理的に意義がある修飾である可能性が高い事を示している（発表論文1）

表1 ラット海馬において見いだされた、6-NO₂Trp を含むタンパク質とそのアミノ酸配列上の位置

Protein	Peptide sequence
Dihydroxyacyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	⁴⁷⁵ K. VPEANSS ⁴⁸³ WMDTVIR. Q ⁴⁸⁰ ⁶⁶⁹ R. VVDGAVGAGQ ⁶¹⁹ WLAFFKK. Y ⁶²³
Tubulin beta-2A, 2B, 2C, and 5 chains	⁷⁷ R. SGFFGQIFRPDVFVGGSGAGNN ¹⁰⁰ WAK. G ¹⁰⁴ *
Alpha-enolase	¹⁸⁹ K. LAQNG ¹⁹⁸ WGVVMVSHR. S ¹⁷⁴
Glutamine synthetase	²⁵ K. IQLMYI ²⁸ WVDGTGEGLR. C ⁴²
Gamma-enolase	¹⁸⁹ K. LAQNG ¹⁹⁸ WGVVMVSHR. S ¹⁷⁴
Actin, cytoplasmic 2 ^o	⁹⁸ K. YPIEHGIVTN ⁹⁹ WDDMEK. I ⁸⁵
Fructose-bisphosphate aldolase C	¹⁹⁹ R. ALQASALSA ²¹⁴ AWR. G ¹¹⁵
Fructose-bisphosphate aldolase A	¹⁹⁹ R. ALQASALSA ²¹⁴ WGGK. K ¹¹⁹
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	⁸¹ K. ⁸⁸ WGDAGA EYVVESTGVFTTMEK. A ¹⁸⁶ ¹⁶⁷ K. LIS ¹⁶¹ WYDNEYGYSNR. V ¹⁷²
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	¹⁸⁷ K. APSSSAGISE ¹⁹⁹ WLDQK. L ²⁰⁴
Phosphoglycerate kinase 1 ^o	¹⁸⁷ K. ¹⁸⁹ WNTEDKVSHVSTGGGASLELLEGG. V ⁴⁰⁷
Creatine kinase U-type, mitochondrial	²⁷ K. SELI ²⁶ WVNEEDHIR. V ⁷¹

(4) 平成24年度

平成23年度の結果で、タンパク質のニトロ化修飾が生理的条件である身体運動中あるいは運動後の細胞機能の制御に関与している可能性が考えられた。中強度持久性走運動及び高強度間欠性走運動によりラットの骨格筋におけるチロシン残基とトリプトファン残基のニトロ化修飾の程度に変化が生じるのか否か、またニトロ化修飾が変化したタンパク質を同定して、そのニトロ化部位を決定し、タンパク質の機能への影響を解明することを目的として実験を行った。実験の結果、中強度持久性走運動と高強度間欠性走運動により約 60kDa 付近に見られるスポットのタンパク質がトリプトファン残基のニトロ化に変化が生じることを見出した。このスポットのタンパク質を質量

分析装置で分析した結果、α-skeletal muscle actin であった。本研究ではα-actin 以外にも身体運動によりニトロ化が変化する可能性のあるタンパク質を見出しており、現在詳細な検討を行っている。

(5) 今後の課題

①平成 25 年度は細胞内シグナル伝達タンパク質のニトロ化に着目して研究を進める予定である。

②さらに、SHR の血清中に高血圧の発症と密接に関連して 6-NO₂Trp が生じるタンパク質を見出しているため、高血圧の病態との関連を明らかにした後、ヒトの血清に応用し高血圧関連病態のバイオマーカーとしての臨床への応用を目指す。

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 6 件)

1. Uda M, Kawasaki H, Shigenaga A, Baba T, Yamakura F “Proteomic analysis of endogenous nitrotryptophan-containing proteins in rat hippocampus and cerebellum” (2012) Bioscience reports, 32: 521-530. doi: 10.1042/BSR20120032
2. H Kawasaki, A Shigenaga, M Uda, T Baba, H Ogawa, K Takamori, F Yamakura. “Nitration of tryptophan in ribosomal proteins is a novel post-translational modification of differentiated and naïve PC12 cells” (2011) Nitric Oxide-Biology and Medicine, 20, 176-182. doi: 10.1016/j.niox.2011.05.005
3. Kawasaki H, Ikeda K, Shigenaga A, Baba T, Takamori K, Ogawa H, Yamakura F, “Mass spectrometric identification of tryptophan nitration sites of proteins in peroxynitrite-treated lysates from PC12 cells” Free Radic Biol Med, (2011) 50: 419-427. doi: 10.1016/j.
4. Osawa M, Yamakura F, Mihara M, Okubo Y, Yamada K, Hiraoka BY “Conversion of the metal-specific activity of *Escherichia coli* Mn-SOD by site-directed mutagenesis of Gly165Thr.” Biochim Biophys Acta (2010) 1804:1775-1779. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.04.011
5. F Yamakura and H Kawasaki: Post-

translational modification of superoxide dismutase, *Biochim Biophys. Acta – Protein and Proteomics* invited review, (2010) 1804, 318-325. doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.010
6. H KIMURA, N Kon, S Furukawa, M Mukaida, F Yamakura, K Matsumoto, H Sone, K Murakami-Murofushi, “Effect of Endurance Exercise Training on Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) after Emergence of Hypertension, (2010) *Clin Exper Hyperten.* 32(7): 407-415. doi: 10.3109/10641961003667930

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 宇田宗弘、川崎広明、重永綾子、馬場猛、山倉文幸、骨格筋におけるニトロトリプトファン含有タンパク質のプロテオーム解析、第 67 回日本体力医学会大会、岐阜、2012 年 9 月
2. 川崎広明、重永綾子、馬場猛、宇田宗弘、高森健二、山倉文幸、細胞分化誘導時で新たに見出された 6-ニトロトリプトファン化タンパク質、第 12 回日本 NO 学会学術集会、神戸、2012 年 6 月
3. 川崎広明、宇田宗弘、富永光俊、重永綾子、高森健二、山倉文幸、新規酸化ストレスマーカー：6-ニトロトリプトファンの生体内生成、第 82 回日本衛生学会学術総会 酸化ストレス連携研究会シンポジウム、京都、2012。(招待講演)
4. Kawasaki H, Shigenaga A, Baba T, Ikeda K, Uda M, Takamori K, Yamakura F. Proteomic and Functional analysis of protein tryptophan nitration in the neuronal cell differentiation., 13th International Society for Tryptophan Research, Shidney, Australia, Nov.7-9, Abstract p.48 2012.
5. Uda M, Kawasaki H, Shigenaga A, Baba T, Yamakura F. Proteomic analysis of endogenous nitrotryptophan-containing proteins in rat hippocampus and cerebellum. 13th International Society for Tryptophan Research, Shidney, Australia, Nov.7-9, Abstract p.45 2012.
6. Yamakura F, Kawasaki H, Tominaga M, Ogawa H, Shigenaga A, Kamo A, Takamori K, Identification of nitrotryptophan in proteins isolated from skin lesions of an atopic model mouse. A possible novel biomarker for atopic predisposition. 13th International Society for Tryptophan Research, Shidney, Australia, Nov.7-9, Abstract p.46 2012.
7. Yamakura F, H. Kawasaki, A. Shigenaga, M. Uda, T. Baba, K. Takamori, Formation of nitrated tryptophan residues as a novel post-translational

modification in the physiological state, The 7th International Conference of the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide, Edinburgh, England, 22-26, July, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, S36, 2012.

8. 川崎広明、重永綾子、宇田宗弘、松本孝、馬場猛、高森健二、山倉文幸 「生体内における 6-ニトロトリプトファン生成の生理的意義の解明に向けて—培養細胞における 6-ニトロトリプトファン産生」日本トリプトファン研究会第 33 回学術集会予稿集 p. 20, 12 月 船橋、千葉
9. 宇田宗弘、川崎広明、重永綾子、馬場猛、山倉文幸 「ラットの海馬と小脳における 6-ニトロトリプトファン含有タンパク質のプロテオーム解析」日本トリプトファン研究会第 33 回学術集会 予稿集 p.21, 12 月 東邦大学、船橋、千葉
10. 宇田宗弘、川崎広明、重永綾子、山倉文幸 「ラットの海馬におけるニトロ化タンパク質に対する走運動の影響」第 6 回日本体力医学会大会 予稿集 p. 160, 2012 9/16-18、下関、9 月
11. 宇田宗弘、川崎広明、重永綾子、馬場猛、山倉文幸 「ラットの海馬におけるニトロ化タンパク質のプロテオーム解析」第 84 回日本生化学会大会、生化学 8、136、2P-0283. 京都 2012 年 9 月
12. 山倉文幸、川崎広明、宇田宗弘、富永光俊、高森健二、“タンパク質の新規ニトロ化修飾—生体内での 6-ニトロトリプトファン生成”第 17 回 MPO 研究会プログラム p. 58, 201110/28-29、熊本市、文部科学省新学術領域研究「活性酸素のシグナル伝達機能」共催 (招待講演)
13. Yamakura F, Kawasaki H, Ikeda, K., Shigenaga, A., Baba, T., Ogawa, H., Takamori, K. Nitration of tryptophan residues is a novel post translational modification occurring in naïve and differentiated PC12 cells, International Symp on Free Radical Research: Contribution to Medicine, Kyoto, Jan 19-21, 2011.
14. M Uda, F Yamakura, Differences in the amounts of nitrated proteins and superoxide dismutase in hippocampus of adult and middle age rats, International Academy of Sportology, March 5, 2011, Tokyo, Japan
15. Yamakura F, Kawasaki H, Shigenaga A, Uda M, Baba T, Ogawa H, Takamori K, “Nitrotryptophan: A novel post translational modification in naïve and differentiated PC 12

cells, The 4th International Symposium Nutrition and Biology in Oxygen and Medicine, June 15-17, 2011, Paris, France, Abstract p34.

16. M. Uda, H. Kawasaki, A. Shigenaga, F. Yamakura, Changes in tyrosine-nitrated proteins in the hippocampus of adult- and middle-aged rat. Experimental Biology 2011, Washington, USA.

17. 川崎広明、池田啓一、重永綾子、馬場猛、小川秀興、高森健二、山倉文幸「新規ニトロトリプトファン抗体を用いた傷害モデル神経培養細胞のニトロプロテオーム解析」第83回日本生化学会大会, 生化学, 1P-0375. 2011, 神戸.

18. 川崎広明、富永光俊、重永綾子、加茂敦子、小川秀興、高森健二、山倉文幸「アトピー性皮膚炎モデル・NC/Nga マウスの皮膚における6-ニトロトリプトファン含有タンパク質の生成」日本トリプトファン研究会 第32回学術集会 予稿集 p.24, 12-4, 5, 2010 彦根.

19. 川崎広明、池田啓一、重永綾子、馬場猛、小川秀興、高森健二、山倉文幸「抗6-ニトロトリプトファン抗体を用いた神経疾患モデル細胞からの新規ニトロ化修飾タンパク質の検出」日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、第6回日本臨床プロテオーム研究会、抄録集、p103, 2010 7.26-27, 浦安市.

20. Kawasaki H, Ikeda, K., Shigenaga, A., Baba, T., Ogawa, H., Takamori, K., Yamakura, F. Generation of 6-nitrotryptophan residues in the proteins of PC12 cell lysate by a peroxynitrite treatment, Abstract of The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and therapeutic Application of Nitric Oxide, pp. 70 , Kyoto, June 14-18, 2010.

21. 宇田 宗弘、安田 従生、古川 覚、川崎 広明、馬場 猛、木村 博子、山倉 文幸「高血圧モデルラット(SHR)の高血圧発症に伴う脳の酸化傷害の変化とそれに対する運動の効果」MBM2009 第82回日本生化学会大会予稿集, 生化学, 81(9) p.385、神戸

22. 川崎広明、池田啓一、高ひかり、藤村務、馬場猛、小川秀興、高森健二、山倉文幸「Peroxynitrite処理PC12細胞ライセートに見出したニトロ化タンパク質アミノ酸配列中のニトロトリプトファン残基部位の決定」MBM2009 第82回日本生化学会大会予稿集 生化学, 81, p.166 , 神戸.

23. 宇田宗弘、安田従生、古川覚、川崎広明、木村博子、山倉文幸, 高血圧モデルラット(SHR)の脳における酸化傷害への自発走運動

の効果, 第64回日本体力医学会大会 2009 9/18-20, 新潟市

24. 安田従生、古川覚、木村博子、向田政博、川崎広明、山倉文幸「高血圧発症後の持久的運動トレーニングが自然発症高血圧ラット心臓のニトロ化ストレスに及ぼす影響」

第9回日本NO学会学術集会プログラム抄録集、p.111,2009/5/8,9, 静岡市

25. H Kawasaki¹, K Ikeda², H Taka³, T Fujimura³, T Baba⁴, H Ogawa¹, K Takamori¹, F Yamakura “Identification of nitrotryptophan by the LC-ESI-MS/MS analysis in the nitrated proteins generated by the treatment of PC12 cell lysate with peroxynitrite” SFRBM 16th annual meeting, San Francisco, USA, November,

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：一酸化窒素ストレスの診断方法
発明者：山倉文幸、川崎広明、酒居一雄
権利者：学校法人順天堂、日研ザイル(株)
種類：特許

番号：特願 2012-162006

出願年月日：平成24年7月20日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

山倉 文幸 (YAMAKURA FUMIYUKI)

順天堂大学・医療看護学部・教授

研究者番号：20053358

(2)研究分担者

川崎 広明 (KAWASAKI HIROAKI)

順天堂大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：40531380

(3)研究分担者

内藤 久士 (NAITO HISASHI)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70188861