

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18500514
 研究課題名（和文） ラットの運動に伴う活性酸素・活性窒素によるタンパク質修飾のプロテオミクス解析
 研究課題名（英文） Proteomics analysis of the modified proteins in rat by reactive oxygen and reactive nitrogen species generated with exercise.
 研究代表者 山倉 文幸（FUMIYUKI YAMAKURA）
 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：

- （1）我々が開発した新規ニトロ化ストレスマーカーである 6-ニトロトリプトファンのマーカーとしての有効性を確立するために、炎症惹起ラットで特異的抗体と LC-MS/MS により検出したところ、Triosephosphate isomerase、Malate dehydrogenase などが候補タンパク質として上がった。
- （2）一方、心臓ミトコンドリア、大動脈血管核画分のニトロチロシンが 25 週齢の自然発症高血圧ラットの非運動群で増加し、10 週間の自発運動トレーニング群では減少した。一方、両組織の運動群のミトコンドリアで MnSOD が特異的に上昇していたので、これがニトロチロシン生成の抑制に関与すると推定された。大脳皮質の各画分のニトロチロシンも測定したが、顕著な違いは見られなかった。現在、25 週齢心臓のミトコンドリア画分を用いて、ニトロチロシン修飾タンパク質を LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析で検討している。大動脈血管においては、ミトコンドリアの MnSOD 量、活性とも 25 週齢で減少し運動群で上昇するという、これも心臓類似の結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：活性酸素、一酸化窒素、プロテオミクス、ラット、運動、ニトロ化ストレス

1. 研究開始当初の背景

生体における生体物質の酸化修飾は、活性酸素がその原因となることは以前から知られ

ていたが、近年一酸化窒素と活性酸素に由来する活性窒素種によるニトロ化と酸化も大きく寄与する事が明らかにされた。一方、運

動に伴い生体物質が酸化修飾されることについては多くの研究がなされてきたが、タンパク質の酸化修飾に関しては解明が遅れている。運動に伴い酸化タンパク質の量などが変動することが知られているが、実際の酸化の標的となっているタンパク質が同定された例はほとんど無い。また、運動に伴いニトロ化がどのように変化するかは全く明らかではない。一方、ニトロ化修飾に関しては、ニトロチロシンの生成が明らかにされていたが、我々はニトロトリプトファンも生成する事をモデルタンパク質で明らかにしている。また、ニトロトリプトファンに対する特異的ポリクロナル、モノクロナル抗体も既に開発している。今回のこの新しいニトロ化マーカーの生体系への応用は初めての試みである。さらに、近年修飾タンパク質の解析として、プロテオミクス解析法が盛んだが、その手法を運動に応用した例はほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見いだした新しいニトロ化マーカー・6-ニトロトリプトファンをラットに適用し、その有用性を確かめる事を第一の目的とする。さらに、ラットを対象とし運動とニトロ化の関係、また、近年その進展が著しい修飾タンパク質のプロテオミクス解析法を駆使し、修飾されているタンパク質の同定を試みる事を第二の目的とする

3. 研究の方法

(1) LPSを20 mg/kg 腹腔内投与し、ラットから各種臓器を摘出後、可溶性画分のタンパク質を調製し、2次元電気泳動後、ウェスタンブロット法で特異的抗体を用い6-ニトロトリプトファンを検出後、トリプシン分解ペプチドをLC-MS/MSで解析した。

(2) 運動の効果のモデルとしては、自然発症高血圧ラット(SHR)への自発運動トレーニングを用いた。高血圧発症前の5週齢と発症時の15週齢をコントロールとし、自発運動トレーニングをその後10週間続けた群と運動をしない群を比較した。各群から、心臓、大動脈血管、脳、腎臓等を単離し、細胞分画を行う。酸化傷害マーカーとして、脂質過酸化

のマーカー4-ヒドロキシノネナール(HNE)を、またニトロ化ストレスマーカーとして3-ニトロチロシンを選び、我々が開発した蛍光イムノアッセイ法でそれらの量を測定する。さらに、抗酸化酵素として銅・亜鉛およびマンガンスーパーオキシドジスムターゼの酵素量と活性を、また一酸化窒素合成酵素の量と活性を測定した。さらに、ニトロチロシンの抗体を用い、反応したスポットについてトリプシン分解後、LC-MS/MSでタンパク質の同定を行う。

4. 研究成果

(1) 腎臓を用いた解析では、投与後12時間後に、iNOSの顕著な発現誘導が見られた。また、12時間群における2次元電気泳動後のウェスタンブロットで、6-NO₂Trp含量が増加したスポットがいくつか検出された。そのスポットの3つの異なるLC-MS/MSシステムで解析したところ、ミトコンドリアのmalate dehydrogenaseをcoverage 24%~46%で、またtriosephosphate isomeraseをcovered 20~40%同定された。それ以外にもcoverageは落ちるが8種類のタンパク質が同定された。しかしながら、MS/MSでニトロ化を受けている事が確認されたトリプトファン残基は同定出来なかった。そのためには免疫沈降等を応用し、修飾ペプチドの濃縮が必要と思われる、現在その手法を確立中である。

(2)

①高感度蛍光イムノアッセイおよび組織染色を用いて高血圧発症後10週間である25週齢の非運動群ラットにおいて、心臓および大動脈血管の画分のうち、それぞれミトコンドリアと核画分においてニトロチロシンの量が増加し、運動群ではその増加が抑制されることを見いだした。また、大動脈血管のHNEも同様の傾向が見いだされた。更に、大脳皮質においては、ミトコンドリア画分のニトロチロシンが5週齢に比較して25週齢運動群のみが有意な低下を示した。細胞質のHNEは運動群で有意な低下が見られた。

②心臓におけるニトロ化・酸化に関与する酵素群のうち、NO合成酵素とCu, ZnおよびMn-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の

変動を Western blot 及び活性測定で検討し、運動に伴い Mn-SOD が上昇することを見いだした。この上昇はその他、活性酸素産生をおこなう酵素に関する検討を行った。銅・亜鉛 SOD は 25 週齢非運動群で活性・酵素量とも減少し、そのことが 25 週齢非運動群でのミトコンドリア画分のニトロチロシンの増加に関与していると考えられた。また、ニトロチロシンの生成に深く関わる一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性と酵素量もけんとうしたが、細胞質画分において 25 週齢非運動群での NOS 活性の有意な上昇を見いだしており、これもニトロチロシンの上昇に関与している事が推定された。

③大動脈血管においても、ミトコンドリアの MnSOD は活性・酵素量とも 25 週齢非運動群で減少し、運動群で増加が見られた。大脳皮質においては、銅・亜鉛 SOD も MnSOD も 25 週齢非運動群も運動群も何れも 5 および 15 週齢群より高い酵素量を示したが運動による変化は無かった。

④ 最も顕著にニトロチロシンが検出され運動効果が見られた、心臓ミトコンドリア画分を用い、2 次元電気泳動後 Western Blot を行い、市販のニトロチロシン抗体を用い、陽性のスポットをトリプシン分解し、LC-MS/MS で、修飾タンパク質を現在解析中である。

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 5 件)

1. 古川 覚, 木村 博子, 向田 政博, 山倉 文幸, 神野 宏司, 池田 啓一 “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” 順天堂医学, 54, 308~317 (2008) (査読有り)

2. Yamakura F, Kobayashi K, Furukawa S, Suzuki Y. In vitro preparation of iron-substituted human manganese superoxide dismutase: possible toxic

properties for mitochondria. Free Radic Biol Med, 2007 43 (3) 423-430. (査読あり)

3. Ikeda K, Yukihiro Hiraoka B, Iwai H, Matsumoto T, Mineki R, Taka H, Takamori K, Ogawa H, Yamakura F. Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by Western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC 12 cells, Nitric Oxide. 2007 16(1):18-28. (査読有り)

4. Leandro C. Tabares, Nestor Cortez, B. Hiraoka, Y. Yamakura F, and Un S, Effects of substrate analoges and pH on manganese superoxide dismutase, (2006) *Biochemistry*, 45,1919-1929. (査読有り)

5. Yamakura F, Ikeda K, Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species, Nitric Oxide, invited review, (2006) 14, 152-161. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 古川 覚, 安田 従生, 木村 博子, 向田 政博, 宮下 愛未, 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による自然発症高血圧ラット心臓におけるニトロ化ストレスの軽減」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 予稿集 p. 357. 神戸

2. 古川 覚, 木村 博子, 向田 政博, 山倉 文幸, 神野 宏司, 池田 啓一, 安田 従生

「高血圧発症後の運動トレーニングは有効か?—自然発症高血圧ラット心臓におけるニトロ化ストレスの抑制—

第6回日本予防医学会学術総会 プログラム・抄録集 p. 50, 2008, 2008/11/29-30 東京医科大学、東京

3. 山倉 文幸, 池田 啓一 新しいタンパク質ニトロ化の指標としての6-ニトロトリプトファン、(招待講演)、第8回日本NO学会学術集会 プログラム抄録集 p. 36 2008/5/9 仙台、仙台国際センター

4. 池田 啓一、神野 宏司、内藤 久土、古川 覚、

松本孝、岩井秀明、高森建二、小川秀興、山倉文幸、LPS投与ラット臓器中の6-ニトロトリプトファン含有タンパク質の特異的抗体を用いた解析、第29回日本フリーラジカル学会学術集会・日本過酸化脂質フリーラジカル学会第31回大会合同学会-プログラム・抄録集、p. 69、2007/6/9、10 名古屋国際会議場（愛知）

5. 池田啓一、神野宏司、内藤久士、古川覚、高森建二、小川秀興、山倉文幸、敗血症モデルラットにおける 6-ニトロトリプトファン含有タンパク質の解析、第7回日本NO学会学術集会プログラム抄録集、p. 85、2007/5/17、18 ピアザ淡海（滋賀）

6. 山倉文幸、新しい生体ニトロ化修飾の指標としての6-ニトロトリプトファン 日本トリプトファン研究会第29回学術集会、プログラム、p.20-21、(集会主催、招待講演)、2007/12/8,9 昭和女子大学（東京）

7. Ikeda K, Hiraoka BY, Matsumoto T, Mineki R, Taka H, Shida N, Amamiya Y, Takamori K, Ohmori D, Yamakura F. Identification of immunoreactive proteins in ONOO⁻-treated PC12 cells by using affinity-purified anti-6-nitrotryptophan antibody, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstracts, p.798 June 18-23, 2006, Kyoto, Japan

8. Yamakura F, Ikeda K, Matsumoto T, Taka H, Kaga N, Formation of 6-nitrotryptophan in purified proteins by reactive nitrogen species: a possible new biomarker, 11th Meeting of the International Study Group of Tryptophan Research-2006 (ISTRY-2006 Tokyo), Program and Abstracts, p.21 July 3-7, 2006, Sanjyo-Kaikan, Tokyo, Japan (招待講演)

9. Ikeda K, Iwai H, Matsumoto T, Mineki

R, Taka H, Takamori K, Ogawa H Yamakura F. Proteomic analysis of 6-nitrotryptophan-containing proteins in peroxynitrite-treated pc12 cells, 11th Meeting of the International Study Group of Tryptophan Research-2006 (ISTRY-2006 Tokyo), Program and Abstracts, p.22, July 3-7, 2006, Sanjyo-Kaikan, Tokyo, Japan, (招待講演)

10. 池田啓一、岩井秀明、松本孝、峯木礼子、高ひかり、高森建二、山倉文幸 パーオキシナイトライト処理PC12細胞における6-ニトロトリプトファン免疫反応タンパク質の同定、第6回日本NO学会学術集会-プログラム・抄録集-、p. 85、2006/5/25、26、シェーンバッハ・サボー（東京）

11. 嶋田武、池田啓一、岩井秀明、信太直己、加納達二、松田繁、河合祥雄、形本静夫、山倉文幸 HPLC-電気化学検出器によるヒト血清中6-ニトロトリプトファンの検出、第4回日本予防医学学会学術総会 要旨集 p.66、2006/12/1,2 大宮ソニックシティ（埼玉）

〔図書〕（計 2 件）

1. Yamakura F, Ikeda, I Matsumoto T, Taka H, Kaga N “Formation of 6-Nitrotryptophan in purified proteins by reactive nitrogen species: a possible new biomarker” in International Congress Series 1304, Elsevier (2007) 22-32. (査読有り)

2. Ikeda K, Iwai H, Matsumoto T, Mineki R, Taka, H Takamori K Ogawa H and Yamakura F “Proteomic analysis of 6-nitrotryptophan containing proteins in peroxynitrite-treated pc12 cells” in International Congress Series 1304, Elsevier (2007) 33-40. (査読有り)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特に無し。

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

内藤 久士 (NAITO HISASHI)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号：70188861

高 ひかり (TAKA HIKARI)
順天堂大学大学院・医学研究科・助教
研究者番号：60338374

池田 啓一 (IKEDA KEIICHI)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教
研究者番号：90453597

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

安田 従生 (YASUDA SUMIO)
順天堂大学大学院・スポーツロジセンター
・研究支援者