

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 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：3260

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700701

研究課題名（和文） 脳において加齢及び運動により変化するニトロ化タンパク質のプロテオミクス

研究課題名（英文） Proteomic analysis of nitrated proteins that change with aging and physical exercise in the brain.

研究代表者

宇田 宗弘（UDA MUNEHIRO）

順天堂大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：80549262

研究成果の概要（和文）：本研究では成熟ラットの海馬から細胞骨格や解糖系酵素を含む 12 個のタンパク質をニトロトリプトファン（6-NO₂Trp）含有タンパク質として同定し、それらのタンパク質のニトロ化された Trp 残基の位置の決定に成功した。また、海馬における 6-NO₂Trp 含有タンパク質は加齢により増加する傾向を示すこと、さらに中齢期のラットへの走運動負荷は海馬の 6-NO₂Trp 含有タンパク質の種類に大きな変化を生じさせないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We identified twelve 6-nitrotryptophan-containing proteins including several cytoskeletal proteins and glycolytic enzymes in the adult rat hippocampus and determined the position of nitrated tryptophan residue with significant ion score levels ($p < 0.05$) in several proteins by proteomic analysis. In addition, the amount of 6-nitrotryptophan-containing protein tended to increase with age. On the other hand, physical exercise on the 12 months old rats did not induce much difference in the positive spots of anti-6-nitrotryptophan antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

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：加齢 脳 ニトロ化タンパク質 ニトロトリプトファン 身体運動

1. 研究開始当初の背景

平成 19 年度の厚生労働省による国民生活基礎調査において、介護が必要となった主な原因として上位を占めるのが脳血管疾患（1 位）と認知症（2 位）である。また認知症は脳血管型認知症とアルツハイマー型認知症

に大きく分けられ、認知症の約 60%はアルツハイマー型認知症である。このアルツハイマー型認知症の脳皮質や記憶・学習を司る海馬では活性酸素の一種であるスーパーオキシドと一酸化窒素から生成されるパーオキ

シナイトライトによって化学修飾された酸化修飾タンパク質であるニトロ化タンパク質の1つであるニトロチロシン ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) 含有タンパク質が増加していることや、 $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ 含有タンパク質の種類が明らかにされている。ニトロ化されたタンパク質はそのタンパク質の機能に変化を及ぼし、ニトロ化タンパク質の増加は正常な細胞の機能を損なう可能性が示唆されている。一方、 $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ 含有タンパク質はアルツハイマー型認知症の脳のみではなく、正常な脳においても存在し、加齢により小脳や大脳皮質、海馬で増加することが明らかにされている。さらに加齢による認知機能の低下は脳の酸化修飾タンパク質の含有量と関係することが示されている。したがって、加齢により脳のどのような細胞のどのようなタンパク質がニトロ化されるのか、またタンパク質の機能に影響を及ぼす部位が修飾されているのかを明らかにして、そのタンパク質のニトロ化を抑制する方法を開発することはアルツハイマー型認知症を含む認知症の発症を抑制するために重要である。

一方、我々は新規ニトロ化産物として 6-ニトロトリプトファン ($6\text{-NO}_2\text{Trp}$) を見出し、 $6\text{-NO}_2\text{Trp}$ に対する特異的な抗体を作成して、培養細胞や炎症疾患モデルマウスにおいて $6\text{-NO}_2\text{Trp}$ 含有タンパク質を見出している。しかしながら、生理的過程の生体内において $6\text{-NO}_2\text{Trp}$ 含有タンパク質が生成されるのか否かは明らかではない。

近年、ヒトにおいて運動が認知機能の改善や、認知症を予防する効果を持つことが明らかにされている。我々は、この運動効果のメ

カニズムとして、学習・記憶機能を司る海馬において運動によって新しい神経細胞が増加することを示した。また、脳由来神経栄養因子などの成長因子やホルモンの増加の関与も示唆されている。しかしながら、運動が加齢による脳のタンパク質のニトロ化を抑制するの否かを明らかにした研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究ではラットの脳の中でも、走運動により神経活動が活性化する海馬において加齢によって増加するニトロ化タンパク質、特に新規ニトロ化産物である $6\text{-NO}_2\text{Trp}$ 含有タンパク質を網羅的に解析して、どのようなタンパク質のトリプトファン (Trp) がニトロ化されているのかを明らかにするとともに、ニトロ化されたタンパク質の機能に関する可能性がある修飾部位を同定することを第1の目的とした。さらに加齢や運動によってニトロ化されたタンパク質の量や種類、修飾部位にどのような変化が生じるのか明らかにすることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

実験動物は6ヵ月(6m)と12ヵ月齢(12m)の雄の F344/N ラットを用いた。採取した海馬からタンパク質抽出を行い、通常の SDS-PAGE、又は2次元電気泳動(2D-PAGE)後、抗 $6\text{-NO}_2\text{Trp}$ 抗体を用いたウェスタンブロッティング(WB)を行った。また 2D-PAGE 後にタンパク質を Sypro Ruby で染色した。WB で検出された陽性スポットをゲルから切り出し、トリプシンで消化したのち、液体クロマトグラフィー/質量分析装置によるタンデム質量分析でタ

ンパク質の同定とニトロ化部位の決定を試みた。走運動はトレッドミルを用いて、運動群には傾斜 15%の上り坂を 15m/min の速度で 1 日 1 時間の走運動を 1 週間に 5 日間行わせた。そしてこの走運動を 4 週間行わせた。非運動群はトレッドミル上に 1 時間放置した。

4. 研究成果

まず、生体内の生理的条件下にある 6 ヶ月齢のラットの海馬において 6-NO₂Trp 含有タンパク質が存在するの否かを 2D-PAGE 及び抗 6-NO₂Trp 抗体を用いた WB で検討した。その結果、多くの抗 6-NO₂Trp 抗体陽性スポットが確認できた (図 1A)。次に Sypro Ruby で染色

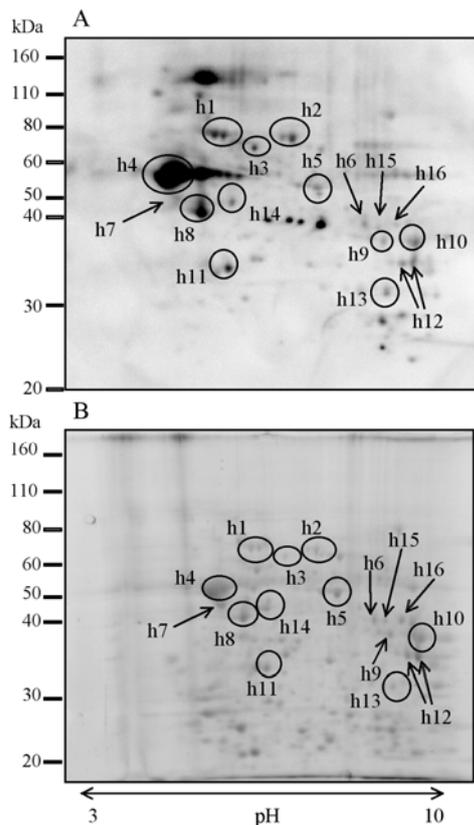


図1 海馬における抗6-NO₂Trp抗体陽性スポット(A)とゲルのSypro Ruby染色(B)

したゲル (図 1B) において抗 6-NO₂Trp 抗体陽性スポットが確認できた 16 個のスポットをゲルから切り出し、各スポットのタンパク

質の同定とペプチド断片内のニトロ化された Trp 残基の位置の決定を試みた。表 1 にはニトロ化された Trp 残基を含むタンパク質とペプチド断片内のニトロ化された Trp 残基の位置を示した。液体クロマトグラフィー/質量分析装置によるタンデム質量分析装置で解析した結果、16 個のタンパク質の中から細胞骨格や解糖系酵素を含む 12 個のタンパク質をニトロトリプトファン含有タンパク質として同定し、さらにニトロ化された Trp 残基の位置の決定にも成功した。これらの結果から生体内の生理的過程において 6-NO₂Trp 含有タンパク質が生成されることが初めて明らかになった。

表1 ラットの海馬におけるニトロ化されたTrp残基を含むタンパク質とペプチド断片内におけるニトロ化されたTrp残基の位置

Protein	Peptide sequence
Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	⁴⁷ K. VPEANSS ⁴⁸ WMDTVIR, Q ⁴⁹ ⁴⁹ R. VVDGAVGAQ ⁴⁹ WLAEFKK, Y ⁵²
Tubulin beta-2A, 2B, 2C, and 5 chains	⁷ R. SGFFGQFRFDNFVFGQSGAGNN ⁴⁹ WAK, G ¹⁰⁴ **
Alpha-enolase	¹² K. LAQNSG ⁴⁸ WGVMSHR, S ¹⁷³
Glutamine synthetase	²⁷ K. IQLMYI ⁴⁸ WVDGTGEGLR, C ¹²
Gamma-enolase	¹² K. LAQENG ⁴⁸ WGVMSHR, S ¹⁷³
Actin, cytoplasmic 2*	⁴⁶ K. YPIEHGVTN ⁴⁸ WDDMEK, ⁸⁰
Fructose-bisphosphate aldolase C	³⁶ R. ALQASALSA ⁴⁸ WR, G ¹¹³
Fructose-bisphosphate aldolase A	³⁶ R. ALQASALSA ⁴⁸ WGGK, K ¹¹³
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	⁴⁶ K. ⁴⁸ WGDAGAEVYVSTGVFTMEK, A ¹⁰⁶ ¹² K. LIS ⁴⁸ WYDNEYGVSNR, V ¹⁵²
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	¹² K. APSSSSAGISE ⁴⁸ WLDQK, I ¹³⁴
Phosphoglycerate kinase 1 [†]	¹² K. ⁴⁸ WNTEDK ⁴⁸ SHVSTGGGASLELEGK, V ⁴⁰⁷
Creatine kinase U-type, mitochondrial	²⁷ K. SFLI ⁴⁸ WVNEEDHTR, V ¹⁷³

Dollface W indicates nitrated tryptophan residue.
[†] All peptides cleared p < 0.05 of the ion scores by the Mascot search.
^{*} Methylation of His (+14 Da) is added for the identification of nitrated tryptophan residue.
^{††} Formylation of Lys (+28 Da) is added for the identification of nitrated tryptophan residue.
^{**} This peptide sequence is identical among 4 isoforms of tubulin beta identified in the present study, and tubulin beta was counted as 1 protein.

次に加齢により海馬の 6-NO₂Trp 含有タンパク質が量的・質的に変化するの否かについて SDS-PAGE 及び 2D-PAGE と WB で検討した。その結果、6-NO₂Trp 含有タンパク質の含有量は 6m に比べて 12m において増加する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった (図 2)。また 2D-PAGE と WB でスポットのパターンの変化を検討した結果、2 群間において抗 6-NO₂Trp 抗体陽性スポットに大きな違いは認められなかった。6m と 12m において 6-NO₂Trp 含有タンパク質の含有量に有意な差が認められなかった原因としては、スーパーオキシドを消去する酵素であるスーパーオ

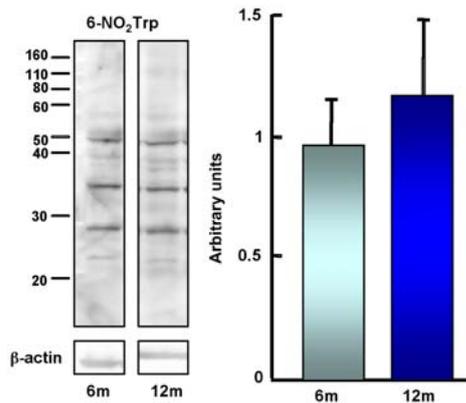


図2 6mと12mの6-NO₂Trp含有タンパク質の含有量の比較

キシドジスムターゼ (SOD) の発現量や、またパーオキシナイトライトの生成に関わる一酸化窒素を発生する一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現量が変化している可能性が考えられる。そこでこれらの酵素の発現について WB で検討した。その結果、Mn-SOD、EC-SOD、nNOS、eNOS 発現は両群間で変化が認められず、また両群において iNOS の発現は観察されなかった。一方、Cu, Zn-SOD 発現は 6m に比べて 12m で有意な増加を示した。したがって、12m においては Cu, Zn-SOD 発現の増加によってスーパーオキシドが消去された結果、6-NO₂Trp 含有タンパク質の含有量に有意な差が認められなかった可能性がある。

最後に 12m のラットに走運動を行わせ、海馬の 6-NO₂Trp 含有タンパク質に変化が生じるのか否かを 2D-PAGE と WB で検討した (図 3)。運動群 (図 3B) と非運動群 (図 3A) の抗 6-NO₂Trp 抗体陽性スポットのパターンを比較した結果、走運動の有無による変化は認められなかった。本研究では海馬に豊富に存在する細胞骨格や解糖系酵素を 6-NO₂Trp 含有タンパク質として同定できたが、海馬において含有量が少ないタンパク質の Trp のニトロ化については同定することができなかった。したがって、含有量が少ないタンパク質の Trp の

ニトロ化に対する走運動の影響についてさらなる検討が必要である。

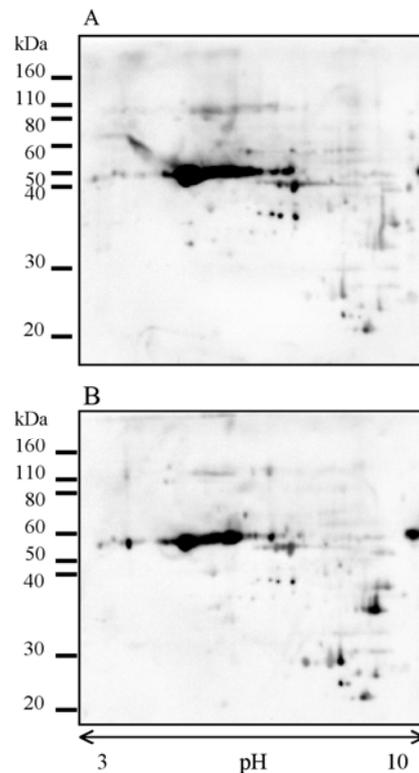


図3 12ヵ月齢の非運動群 (A) と運動群 (B) のラットの海馬における抗6-NO₂Trp抗体陽性スポットの比較

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 1 件)

Kawasaki H, Shigenaga A, Uda M, Baba T, Ogawa H, Takamori K, Yamakura F.. Nitration of tryptophan in ribosomal proteins is a novel post-translational modification of differentiated and naïve PC12 cells. Nitric Oxide, 査読有、2011, 25(2), 176-182.

[学会発表] (計 5 件)

① Munehiro Uda, Hiroaki Kawasaki, Fumiyuki Yamakura, Differences in the amounts of nitrated proteins and superoxide dismutase in hippocampus of

adult and middle age rats. The Inaugural International Academy of Sportology, 3月5日、2011年、東京

② Munehiro Uda, Hiroaki Kawasaki, Fumiyuki Yamakura, Changes in nitrated protein content and expressions of superoxide dismutase and nitric oxide synthase in the hippocampus of adult and middle aged rat. Experimental Biology 2011, 2011年4月13日、ワシントンD.C., U. S. A.

③ 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に対する走運動の影響、第66回日本体力医学会大会、2011年9月16日、山口

④ 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、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、京都

⑤ 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、第33回日本トリプトファン研究会 (JSTRY) 学術集会、2011年12月4日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田 宗弘 (UDA MUNEHIRO)

順天堂大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80549262

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし