

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700761

研究課題名(和文) 身体運動後の骨格筋におけるニトロ化タンパク質のプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis of nitrated proteins in the skeletal muscle after physical exercise.

研究代表者

宇田 宗弘 (Uda, Munehiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80549262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラットの骨格筋においてニトロトリプトファン含有タンパク質が生成されることを見出した。また高強度間欠性走運動直後の骨格筋におけるトリプトファン残基のニトロ化修飾には変化が認められなかった。この結果は安静状態におけるニトロトリプトファン含有タンパク質が活性酸素種や活性窒素種のスカベンジャーとして機能している可能性が低いことを示している。また高強度間欠性走運動直後の骨格筋における約60kDaの - アクチンとシグナル伝達タンパク質であるERKのトリプトファン残基のニトロ化修飾も変化が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We identified nitrotyptophan-containing proteins from adult rat skeletal muscle under physiological condition. The degree of typtophan nitration in the skeletal muscle were not changed by high intensity intermittent running. Thus, nitrotyptophan-containing proteins under physiological condition may not function as a scavenger of reactive oxygen and nitrogen species. In addition, the typtophan nitration of alpha-skeletal muscle actin, which is detected at approximately 60 kDa, and ERK that is involved in the signal transduction in cells were not changed by high intensity intermittent running.

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：ニトロトリプトファン 高強度間欠性走運動 細胞内シグナル伝達タンパク質 プロテオーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

血糖の約 70%は骨格筋に取り込まれて消費される。この骨格筋の血糖の取り込み機能が低下することで2型糖尿病を発症する。これは骨格筋において生体内の血糖を下げる唯一のホルモンであるインスリンに対する感受性が低下(インスリン抵抗性)することが原因である。一方、身体運動による骨格筋の収縮は骨格筋による血糖の取り込みを促進させることが示されており、糖尿病の予防や治療には中強度(LT レベル)の持久性運動が効果的であることが明らかにされている。一方、近年、高強度間欠性運動も骨格筋の糖の取り込み機能を中強度持久性運動よりも向上させる効果があることが示され、そのメカニズムが注目されている。これまで多くの研究により筋収縮による糖の取り込みの制御にはAMP キナーゼ、カルシウムイオン、活性酸素種、一酸化窒素が関わるシグナル伝達系が関係していることが明らかにされてきた。しかしながら、依然としてそのメカニズムは完全には解明されていない。このメカニズムの解明はより効果的な糖尿病の予防や治療のための運動プログラム・運動療法の開発に必要である。

タンパク質のニトロ化修飾は、活性酸素と一酸化窒素の反応で生じるパーオキシナイトライトまたはそれらに由来する二酸化窒素によって生体内で生じる。これらは酸化ストレス亢進時に増加するので、タンパク質のニトロ化修飾の増加は生体内での酸化ストレス増加のマーカーとして用いられてきた。しかしながら、近年ではチロシン残基のニトロ化が細胞内シグナル伝達を制御している可能性のあることが明らかになっている。特に骨格筋においては摘出筋への電気刺激により誘発した筋収縮により発生する活性酸素や一酸化窒素を消去することにより、筋収縮時の糖の取り込み量が低下し、またタンパク質のチロシン残基のニトロ化の程度も低下することが報告され、骨格筋の収縮時に生じるタンパク質のニトロ化修飾が糖の取り込み機能の制御に関与している可能性が示されている。また一定期間の走運動トレーニングによっても骨格筋におけるチロシン残基の

ニトロ化修飾の程度が増加することが明らかにされている。しかしながら、どのような運動の種類によってタンパク質のニトロ化が変化するのか、また、どのようなタンパク質のチロシン残基のニトロ化の程度が変化するのかは明らかにされていない。さらにこれまで明らかにされているシグナル伝達系におけるタンパク質のリン酸化修飾との関係も不明である。

一方、我々はトリプトファン(Trp)残基もニトロ化(ニトロトリプトファン)されることを見出し、我々の研究室で独自に開発した抗体を用いてラットの脳におけるニトロトリプトファン( $\text{NO}_2\text{Trp}$ )含有タンパク質を同定し、タンパク質内におけるニトロ化修飾されたTrp残基の部位の同定にも成功している。また予備実験において骨格筋においても $\text{NO}_2\text{Trp}$ が生じていることを既に確認している。Trp残基のニトロ化はチロシンより、より生理的に近い状態で生じる事を我々は確認しており、シグナル伝達に関与する修飾としては、むしろチロシンより重要である。従って、走運動によりチロシン以上にTrp残基のニトロ化修飾が変動する可能性がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では高強度間欠性走運動によりラットの骨格筋におけるTrp残基とチロシン残基のニトロ化修飾の程度に変化が生じるのか否か明らかにし、また②ニトロ化修飾が変化したタンパク質を同定する。さらに③ニトロ化修飾とリン酸化修飾との関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では正常な状態における骨格筋の $\text{NO}_2\text{Trp}$ 含有タンパク質を分析するために6ヵ月の雄のF344ラットを、また高強度間欠性走運動後の骨格筋における $\text{NO}_2\text{Trp}$ 含有タンパク質の分析に3ヵ月齢の雄のF344ラットを使用した。高強度間欠性運動はラットを高強度間欠性走運動群と非運動群に分けて、高強度間欠性走運動群にはトレッドミルを用いて、50m/minの速度で1分間の走運動を1分間隔で18回行わせた。主に遅筋線維で構

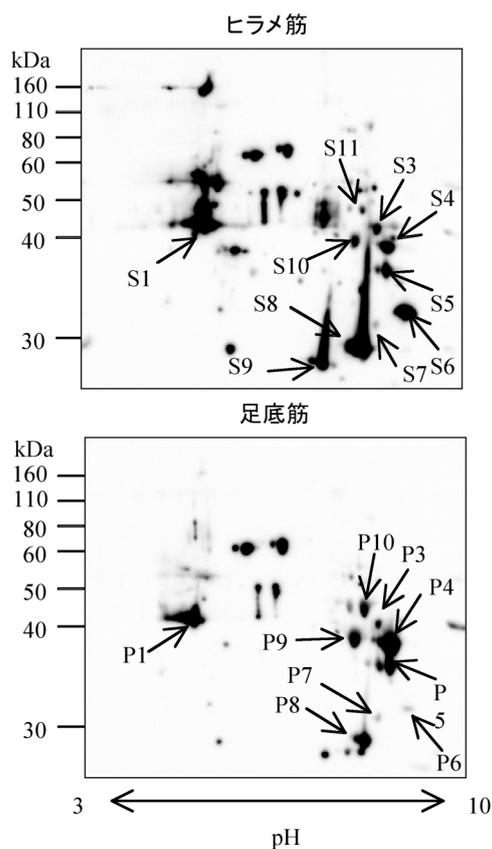


図1 10%ゲルを用いた場合のヒラメ筋と足底筋における抗ニトロトリプトファン抗体陽性スポット

成されるヒラメ筋と主に速筋線維で構成される足底筋は運動直後に採取した。NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質は二次元電気泳動(2D-PAGE)を行った後、抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体を用いてウェスタンブロッティング (WB) を行って検出した。またそれと並行して行った 2D-PAGE 後のゲルは Sypro Ruby を用いてタンパク質を染色し、WB で陽性反応が検出されたスポットを切り出してトリプシンで消化した。その後、液体クロマトグラフィー/質量分析装置を用いて NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質の同定を行った。2D-PAGE 後の抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体を用いた WB において、Trp 残基のニトロ化修飾が変化する可能性のあるスポットについては、Sypro Ruby で染色したゲルから目的のスポットを切り出して脱色し、サンプルバッファーを加えて加熱した後、通常の SDS-PAGE に切り出したゲルを詰め込み、電気泳動を行った。その後、WB とメンブレンの Sypro Ruby 染色を行い、Trp 残基のニトロ化修飾の変化を解析した。さらにこれまでニトロ化修飾されることが報告されているシグナル伝達タンパク質で

ある AKT と ERK1/2 について各タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行って単離し、タンパク質のニトロ化修飾を WB で検討した。

#### 4. 研究成果

まず、6 ヶ月齢のラットのヒラメ筋と足底筋を用いて、安静状態における NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質について検討した。図 1 には 10%のゲルを用いた場合の抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体の陽性スポットを示した。ヒラメ筋と足底筋における多くの抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体の陽性反応は同様な位置に認められた。次にこれらのスポットのタ

表1 ヒラメ筋と足底筋におけるニトロトリプトファン含有タンパク質

Spot No.	Protein	Sequence coverage (%)	
		sol	pla
S1, P1	Actin, alpha skeletal muscle	83	76
S2	Actin, alpha skeletal muscle	71	-
P2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	-	86
S3, P3	Creatine kinase S-type, mitochondrial	74	70
S4, P4	Fructose-bisphosphate aldolase A	94	96
S5, P5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	74	86
S6, P6	Four and half LIM domains protein 1	93	79
S7, P7	GAPDH	69	74
S8, P8	Carbonic anhydrase 3	94	84
S9	Carbonic anhydrase 3	80	-
S10, P9	Creatine kinase M-type	84	90
S11, P10	Beta-enolase	74	75
S12, P11	Serotransferrin	66	60
S13, P12	Aconitate hydratase, mitochondrial	65	68

ンパク質を同定した。表 1 には両方の筋から同定された NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質を示した。ヒラメ筋と足底筋における多くの NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質は同じタンパク質であった。したがって、この結果は両方の筋から同定された NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質は筋線維組成の違いに関係なく安静状態においてニトロ化修飾されていることを示している。

これまで安静状態においてニトロ化修飾されているタンパク質が活性酸素種や活性窒素種のスカルベンジャーとして働いている可能性が考えられている。活性酸素種や活性窒素種は身体運動や筋の収縮により活動筋においてその産生が増加する。したがって、

本研究で同定された NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質がスカベンジャーとして機能しているならば、NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質が身体運動後の筋において増加する可能性が考えられる。この可能性を明らかにするために、高強度間欠性走運動を行わせた直後の骨格筋を採取してタンパク質のニトロ化修飾に変化が生じるのか否かを検討した。図2にはヒラメ筋と足底筋における NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質に対する高強度間欠性走運動の影響を示した。ヒラメ筋と足底筋における NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質は走運動直後に変化が認められなかった。したがって、安静状態において Trp 残基がニトロ化修飾されているタンパク質は活性酸素種や活性窒素種のスカルベンジャーとして機能している可能性は低いものと思われる。

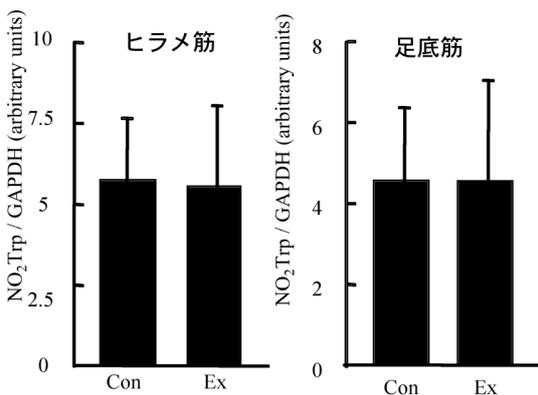


図2 ヒラメ筋と足底筋におけるNO<sub>2</sub>Trp含有タンパク質の運動群(Ex)と非運動群(Con)の比較

次に2次元電気泳動と抗NO<sub>2</sub>Trp抗体を用いて、高強度間欠性走運動により Trp 残基のニトロ化修飾に変化が生じるタンパク質の探索を行った。両方の筋におけるほとんどのスポットは走運動の影響が認められなかった。しかし約 60kDa のスポットの陽性反応に変化が見られた。このタンパク質を液体クロマトグラフィー/質量分析装置で分析したところ、 $\alpha$ -skeletal muscle actin であることが判明した。次に約 60kDa の  $\alpha$ -skeletal muscle actin スポットの Trp 残基のニトロ化修飾が高強度間欠性走運動により変化するか否かを検討した (図3)。解析の結果、約 60kDa の  $\alpha$ -skeletal muscle actin の Trp 残基のニトロ化修飾は統計的に有意な差は認められなかったが、走運動直後に低下する傾向が認められた。

次に細胞内のシグナル伝達にかかわるタ

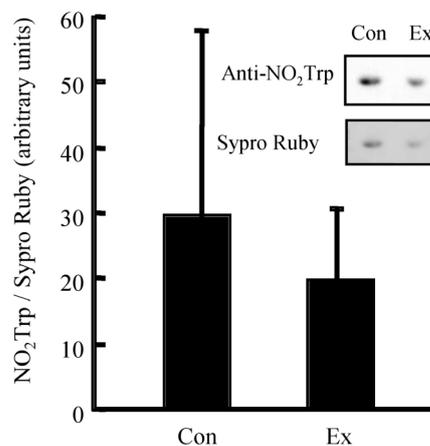


図3 運動群(Ex)と非運動群(Con)における60kDaの $\alpha$ -アクチンのTrp残基のニトロ化に対する走運動の影響

ンパク質の Trp 残基のニトロ化修飾に着目して実験を行った。これまで AKT と ERK1/2 のチロシン残基がニトロ化修飾されることが明らかにされている。そこで、高強度間欠性走運動によりヒラメ筋におけるこれらのタンパク質のチロシン残基と Trp 残基のニトロ化修飾に変化が生じるのか否かについて免疫沈降と WB で検討した。AKT の抗ニトロチロシン抗体と抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体の陽性反応は運動群と非運動群において認められなかった。一方、ERK の抗ニトロチロシン抗体の反応は AKT と同様に検出できなかったが、抗 NO<sub>2</sub>Trp 抗体の陽性反応は ERK1 において検出することができた。この ERK1 における Trp 残基のニトロ化修飾は運動群と非運動群において変化が認められなかった。

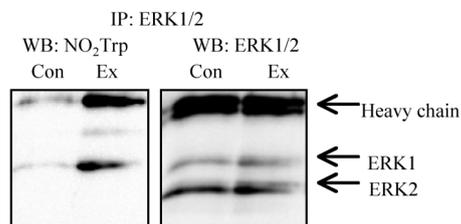


図4 運動群(Ex)と非運動群(Con)のヒラメ筋におけるERKのトリプトファン残基のニトロ化

本研究では骨格筋において収縮タンパク質や解糖系酵素などを NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質として同定した。また走運動直後のタンパク質の Trp 残基のニトロ化修飾には変化が認められなかった。したがって、安静状態において同定された NO<sub>2</sub>Trp 含有タンパク質が活性酸素種や活性窒素種のスカルベンジャーとして機能している可能性は低いものと思われる。また約 60kDa の  $\alpha$ -skeletal muscle

actinやERK1のTrp残基のニトロ化修飾も走運動直後には変化が認められなかった。そして走運動により細胞内シグナル伝達タンパク質のニトロ化修飾が変化しなかったことから、3番目の研究目的であったニトロ化修飾とリン酸化修飾の関係については明らかにすることができなかった。本研究では高強度間欠性運動の直後の筋を用いて分析を行った。Trp残基のニトロ化修飾が身体運動に対する筋の適応に関与しているのか否かについての結論を得るためには、走運動直後のみではなく、走運動後の時間の経過やトレーニングの影響によるTrp残基のニトロ化修飾の変化についてさらなる検討が必要である。

#### 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1件)

Uda M, Kawasaki H, Shigenaga A, Baba T, Yamakura F.

Proteomic analysis of endogenous nitrotryptophan-containing proteins in rat hippocampus and cerebellum.

Biosci Rep. (査読有り), 2012 Dec;32(6):521-30. doi: 10.1042/BSR20120032

[学会発表] (計3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、2012年9月15日、岐阜県

②Munehiro Uda, Hiroaki Kawasaki, Ayako Shigenaga, Takeshi Baba, Fumiyuki Yamakura, Proteomic analysis of endogenous nitrotryptophan-containing proteins in rat hippocampus and cerebellum. 13th International Society for Tryptophan Research, 2012年11月8日、Sydney, Australia

③Munehiro Uda, Hiroaki Kawasaki, Kyoichi Iizumi, Ayako Shigenaga, Takeshi Baba, and Fumiyuki Yamakura, Presence of nitrotryptophan-containing proteins in the adult rat skeletal muscle, 20th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2013年11月22日、San Antonio, TX, U. S. A.

#### 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