

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350907

研究課題名(和文) タンパク質の新規酸化修飾産物を用いた脳血管疾患の予防マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of preventive markers for cerebrovascular disease using novel oxidized modification products of proteins

研究代表者

山倉 文幸 (Yamakura, Fumiyouki)

順天堂大学・国際教養学部・特任教授

研究者番号：20053358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管疾患には酸化傷害が関わっているが、その予防マーカーとして我々が見いだしたトリプトファン残基のニトロ化(N02Trp)の有用性を検討した。すでに脳卒中易発性高血圧発症ラット(SHRSP)の脳卒中発症直前の血清において、アポリipoprotein E (ApoE)のN02Trp化を見いだしているが、そのN02Trp化が臓器での傷害を反映するものであるかの検討のため、心臓、脳、肝臓、腎臓でApoEを調べた。ApoEのN02Trp化は確認できなかったが、心臓、脳、肝臓で新たなタンパク質のN02Trp化を見だし、特に肝臓のarginosuccinate synthaseは高血圧の発症への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is known to participate for development of cardiovascular diseases. We have developed a new marker for oxidative stress, which is 6-nitrotryptophan (N02Trp). We have applied this method for stroke-prone spontaneously hypertensive rat, SHRSP. We have found N02Trp in apolipoprotein E (ApoE), in serum from SHRSP at 18 weeks of age, just before onset of the stroke. In order to clarify the relation between tissue injury and N02Trp in ApoE, we have checked heart, brain, liver, and kidney of the SHRSP. However, we could not observed N02Trp in ApoE in each of the tissues. Instead, we observed four other proteins in heart, 5 other proteins in brain, 10 other proteins in liver as N02Trp containing proteins. Among them, arginosuccinate synthase in liver is important, because this enzyme is known to control formation of nitric oxide, an important regulator of hypertension. Therefore, nitration of this enzyme may participate formation of hypertension, at least partly, in SHRSP.

研究分野：生物化学

キーワード：ニトロトリプトファン 酸化傷害 脳卒中易発性高血圧発症ラット アポリipoprotein E arginosuccinate synthase

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は、近年がん、糖尿病、神経変性疾患、自己免疫疾患の危険因子として明確に認識されているのみならず、循環器系疾患の原因である動脈硬化等の血管傷害の発症・進展にも大きく関与する事が明らかにされている (Ross R, N Eng J Med 340:115 (1999))。これら慢性炎症が作用する実質細胞には臓器により性状が異なるためその傷害には臓器特異性が存在する。慢性炎症の血清でのマーカーとしては、高感度 C-related protein (CRP) の有用性が明らかとなっているが、臓器特異的なマーカーではなく、必ずしも血管傷害の進展を反映している証拠とはならない。また、通常低リスクと判断される血中 CRP 値でも血管傷害の進展が見られることもあり、血管傷害に対してより特異性の高いマーカーが求められている。そこで、我々は特に脳血管障害に注目し、その早期のマーカーとして酸化修飾タンパク質の有用性を検討することにした。

(1) [炎症・酸化ストレスと新規酸化修飾マーカー, 6-ニトロトリプトファン]

炎症下では白血球、マクロファージ、血管内皮などの間質細胞から生じる活性酸素が酸化ストレスを生じ、実質細胞へその影響が及ぶ事が知られている。また、炎症下の間質細胞や血管内皮では、iNOS や eNOS といた一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって、一酸化窒素の産生が促進されていることが分かっている。我々は、酸化ストレスによるタンパク質修飾の新しい形として、これら一酸化窒素と活性酸素との反応で生じる活性窒素種 (RNS) がタンパク質中のトリプトファン残基をニトロ化して 6-ニトロトリプトファン (6-NO₂Trp) を生成することを見いだした。また、その特異的抗体を開発して、病態下、非病態下で生体内に生じた 6-NO₂Trp を検出する方法を確立することに成功した (1) (2)。既に報告のある 3-ニトロチロシンなどの RNS によるタンパク質中のアミノ酸修飾は、動脈硬化部位などに生成されることが見出されていたが、血液中のマーカーとしての有効性を検討されたことは無く、また、脳血管疾患の患部病変組織や血中などで、特定タンパク質中に生成されるという報告もなされていない。

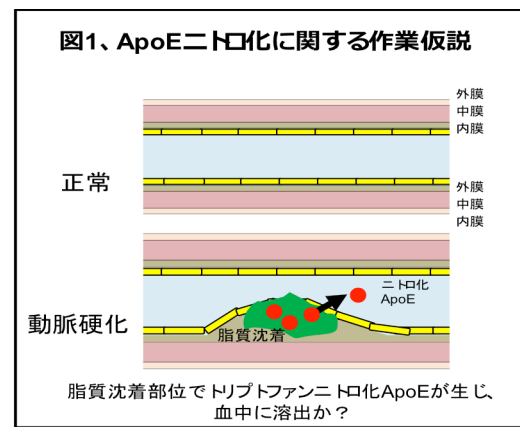
(1) Kawasaki, H, Shigenaga, A Takamori, K Yamakura, F (2011) *Nitric Oxide-Biology and Medicine*, 20, 176-182.

(2) Yamakura F. and Kawasaki H., (2010) *Biochim Biophys. Acta - Protein and Proteomix: Review*, 1804, 318-325. ,

(2) [SHR-SP の血清中に 6-NO₂Trp 含有タンパク質としてアポリポプロテイン E (Apo E) を見出した]

我々は、脳卒中易発性高血圧ラット (SHR-SP) を、脳血管傷害に発展する高血圧症

のモデルとして用いた。雄 SHR-SP ラットは 25 週齢でほぼ 100% が脳卒中で死亡する。予備的な実験として、高血圧発症後の 18 週齢の雄 SHR-SP ラットの血清を用い、特異的な 6-NO₂Trp 含有タンパク質の探索を行った。その結果、SHR-SP ラットの血清のみに見出せる 6-NO₂Trp を含むタンパク質を発見することに成功した。このタンパク質の同定を LC-MS/MS 解析で行ったところ、Apolipoprotein E (ApoE) であることが判明した。ApoE は VLDL の構成要素の 1 つとして発見されたアポリポタンパク質の 1 種であり、脂質輸送・代謝において重要な役割を担うリポタンパク質の構成要素である。このことから、血管壁への脂質沈着が認められる脳血管疾患の動脈硬化巣など病変部において、その患部状況を反映して、ApoE 中に 6-NO₂Trp が生じている可能性があるものと考えた。(図 1)



2. 研究の目的

(1) 血清中 Apo E のニトロ化と SHR-SP ラットの高血圧・脳卒中病態との関連を明らかにする。さらに、脳卒中を発症しない高血圧モデルラットである SHR ラットとの比較を行い脳卒中のリスクマーカーとしての可能性を検討する。また、SHR-SP ラットの大脳、心臓、肝臓、腎臓でのニトロ化 Apo E の存在を明らかにする。

(2) SHR-SP ラットの大脳、心臓、肝臓、腎臓において、ApoE 以外の特異的 6-NO₂Trp 含有タンパク質を探索し、ApoE に加えて脳卒中に至る傷害に関与する可能性がある被修飾タンパク質を見出す。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下に示した実験項目を設定し実行する。

(1) 血清中 ApoE のニトロ化と高血圧・脳血管傷害との関連性の解析

WKY ラットおよび SHR-SP ラットを用いて、脳卒中発症直前の週齢 (18 週) での大脳、心臓、肝臓、腎臓におけるニトロ化 ApoE 生成を検出する (手技: ウェスタンブロッティング・組織化学解析、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を中心とする)

(2) 脳卒中に至る傷害の原因としてのトリ

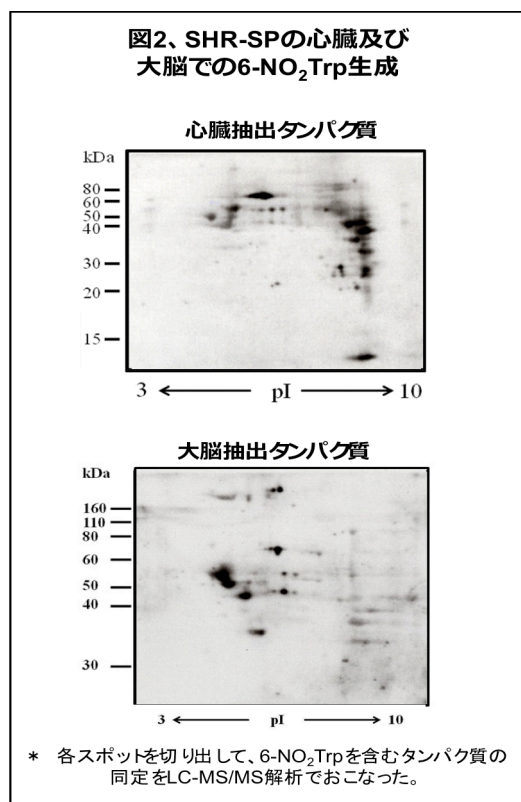
プトファンニトロ化の解析

WKYラットおよびSHR-SPラットの脳、心臓、肝臓、腎臓におけるニトロ化タンパク質を検出する。また、それらのタンパク質の同定とニトロ化トリプトファンの位置をLC-MS/MSで解析し、機能に及ぼす影響を予測し、脳血管傷害との関連を調べる。

4. 研究成果

平成26年度

SHR-SPラットの血清中に認められるトリプトファンニトロ化 ApoE が、高血圧下の循環器や脳血管の障害を反映するものであるかを明らかにするため、循環器や脳における ApoE のトリプトファンニトロ化を調べた。脳卒中直前の18週齢の SHR-SP の心臓および脳からタンパク質抽出を行い、抗ニトロトリプトファン抗体を用いたウェスタンブロットと質量分析によりニトロ化タンパク質の検出を試みた。その結果、下図2に示した通り、ニトロトリプトファン生成が顕著に増加している事が示された(図2)。



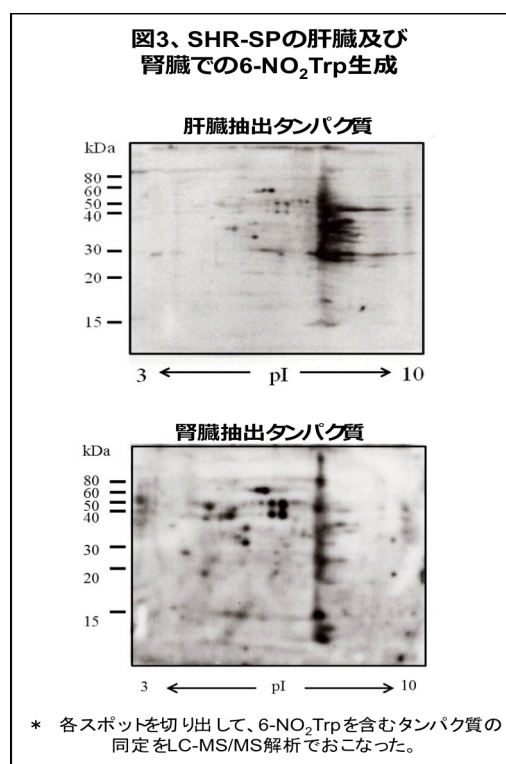
上図2においてシグナルが検出されたスポットに対して、質量分析によるトリプトファンニトロ化タンパク質の同定を行ったところ、心臓では Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (ACC. No. P04794), Triosephosphate isomerase (ACC. No. P48500), Galactoside 2-alps-L-fucosyltransferase 2 (ACC. No. Q10984), Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (ACC. No. Q9Z2L0) の4種のタンパク質中に、

大脳では、Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (ACC. No. Q62849), Tublin beta-2A-chain (ACC. No. P85108), Alpha-enolase (ACC. No. P04764), Beta-enolase (ACC. No. P15429), LIM/homeobox protein Lhx5 (ACC. No. P61376) の5種タンパク質中にニトロトリプトファンを確認した。ニトロ化を受けているトリプトファン残基は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase はN末端側から数え85番目、Triosephosphate isomerase は169番目、Galactoside 2-alps-L-fucosyltransferase 2 は135番目、Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 は64番目と75番目の2カ所、Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 は478番目、Tublin beta-2A-chain は101番目、Alpha-enolase と Beta-enolase は365番目、LIM/homeobox protein Lhx5 は25番目であった。

ApoE に関しては、常法ではこれら組織から検出できなかったため、種々の工夫を施した変法を用いて追試を行ったが、検出には成功しなかった。また、今回の実験で新たに検出されたトリプトファンニトロ化タンパク質に関して、被修飾トリプトファン残基の当該タンパク質機能との関連性について文献等で調べたが、有効な情報は得られなかった。

平成27年

昨年同様に SHR-SP ラットを用いて高血圧下でニトロトリプトファンを生じるタンパク質の検出を18週齢の WKY および SHR-SP の肝臓および腎臓を用いて行った。



それぞれウエスタンブロット上で対照のWKY ラットと比較したところ、前頁の図3に示した通り、ニトロトリプトファン生成がSHR-SPで顕著に増加している事が示された。上図3においてシグナルが検出されたスポットに対して質量分析によるトリプトファンニトロ化タンパク質の同定を行ったところ、肝臓からは carbonic anhydrase III (ACC. No. P14141), Bataine-homocysteine S-methyltransferase I (ACC. No. 009171), Argininosuccinate synthase (ACC. No. P09034), Thiosulfate sulfurransferase (Acc. No. P24329), Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (Acc. No. Q9WVK7) の5種のタンパク質中に、腎臓では Actin, cytoplasmic2 (ACC. No. P63259), Alpha enolase (ACC. No. P04764), Glycine amidinotransferase (ACC. No. P50442), Aconitate hydratase (ACC. No. Q9ER34), Glutathione S-transferase alpha-3 (ACC. No. P0494), Nucleoside diphosphate kinase B (ACC. No. P19804), Alpha-crystallin B chain (ACC. No. P23928) の7種のタンパク質中にニトロトリプトファンを見いだすことが出来た。ニトロ化を受けているトリプトファン残基は carbonic anhydrase III は N 末端側から数え 47 番目, Bataine-homocysteine S-methyltransferase I は 244 番目, Argininosuccinate synthase は 179 番目, Thiosulfate sulfurransferase は 36 番目, Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase は 277 番目, Actin, cytoplasmic2 は 79 番目, Alpha enolase は 365 番目, Glycine amidinotransferase は 210 番目, Aconitate hydratase は 241 番目, Glutathione S-transferase alpha-3 は 21 番目, Nucleoside diphosphate kinase B は 78 番目, Alpha-crystallin B chain は 60 番目であった。

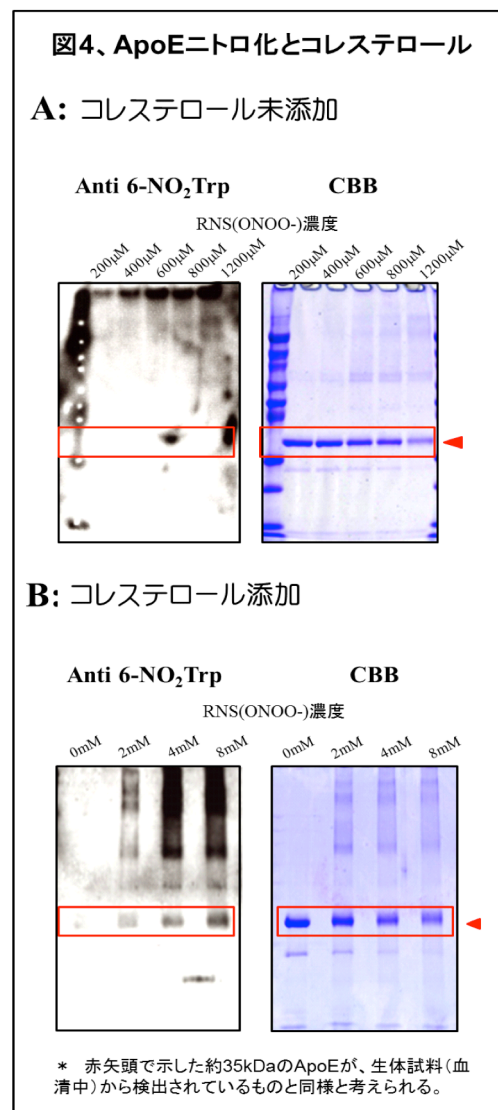
昨年度と同様に、被修飾トリプトファン残基とタンパク質機能との関連について文献等で調べたところ、argininosuccinate synthase に関しては、トリプトファンニトロ化部位が酵素活性に重要な領域の近傍に存在することも判明した。この argininosuccinate synthase は、血圧調節に重要な NOS の基質であるアルギニンの代謝経路の一端を担うことから、この酵素のトリプトファンニトロ化が NO 産生系に影響を与えることで SHR-SP の高血圧症発症機序そのものに関与している可能性が高いと考えられる。

平成28年度

我々は動脈硬化部位などの疾患病変部で、酸化されたリポタンパク質中で ApoE のトリプトファンニトロ化が生じ、被修飾後に血中に溶出されているという作業仮説のもと研

究を遂行してきた(図1参照)。しかし前年度までの研究で、心臓や脳など各種組織中からは ApoE のトリプトファンニトロ化を検出できなかったことから、トリプトファンニトロ化 ApoE の生成は病変組織中ではなく血中で生じているのではないかという新たな仮説を立てた。そこで、血中でトリプトファンニトロ化を受けている ApoE の詳細を調べるために、血中リポタンパク質を簡易的に分離し、各画分中のトリプトファンニトロ化 ApoE の有無を調べた。その結果、LC-MS/MS 解析によって、VLDL/LDL/キロミクロンを含む画分中にトリプトファンニトロ化 ApoE が生じていることを明らかにした。

また、*in vitro* で組み換え体 ApoE に対してアポリポタンパク質以外のリポタンパク質構成成分である脂質(トリパルミチンまたはコレステロール)を添加し、活性酸素に曝露する実験を行った。その結果、コレステロールと混和された ApoE に *in vivo* と同様の約 35kDa のトリプトファンニトロ化 ApoE の生成が認められた(図4)。



一方、トリパルミチンと混和された ApoE では 6-NO₂Trp は生成されなかった。これらの結

果から、トリプトファンニトロ化 ApoE は血中でコレステロールと共存する状態のリポタンパク質中で、既に生成されている可能性があることが示された。

今後の課題

今後の研究では、①血中でトリプトファンのニトロ化を受けたりポタンパク質中の ApoE が脂質代謝にどのような影響を及ぼして脳血管障害の病態形成に関与しているのか、②Argininosuccinate synthase のトリプトファンニトロ化が酵素機能にどのような影響を及ぼしているのか、の2点に着目をして、被修飾タンパク質の機能傷害と疾患病態形成の関連性に着目をした研究をさらに発展させる予定である。

トリプトファンニトロ化タンパク質の脳血管疾患マーカーとしての有用性の検証については、本研究期間中に十分な展開をすることができなかった。今後、SHR との比較実験を継続してゆく予定である。

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 7 件)

- 1) Otsu A, Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Matsuda H, Takahashi N, Nakajima T, Naito H, Baba T, Ogawa H, Tomooka Y, Yamakura F, Takamori K, The accumulation of immunoglobulin G against *Dermatophagoides farinae* tropomyosin in dorsal root ganglia of NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptom, *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 15;485(4):707-712. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.109. Epub 2017 Feb 24 査読有り.
- 2) Kusube F, Tominaga M, Kawasaki H, Yamakura F, Naito H, Ogawa H, Tomooka Y, Takamori K, Electrophysiological properties of brain-natriuretic peptide- and gastrin-releasing peptide-responsive dorsal horn neurons in spinal itch transmission. (2016) *Neuroscience Letters*, 627:51-60, doi: 10.1016/j.neulet.2016.05.051. Epub 2016 査読有り
- 3) Degendorfer G, Chuang CY, Kawasaki H, Hammer A, Malle E, Yamakura F, Davies MJ. Peroxynitrite-mediated oxidation of plasma fibronectin. (2016) *Free Radic. Biol Med* 97:602-615. 査読有り
- 4) Uda M, Kawasaki H, Iizumi K, Shigenaga A, Baba T, Naito H, Yoshioka T, Yamakura F, Sumoylated α -skeletal muscle actin in the skeletal muscle of adult rats., (2015). *Mol. Cell. Biochem.*409:59-66 査読有り

5) Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Iizumi K, Kimura U, Ogawa H., Takamori K, Yamakura F, “Importance of tryptophan nitration of carbonic anhydrase III for the morbidity of atopic dermatitis” *Free Radic Biol Med* (2014) 73:75-83. 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

- 1) Iizumi K, Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Takamori K, Yamakura F, Studies on a novel biomarker for atopic dermatitis, The16th International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Vancouver, Canada, July 17-21, 2016
- 2) Kawasaki H, Ikeda M, Sakai K, Matsumoto M, Iizumi K, Baba T, Takamori K, Yamakura F, Identification of 6-NO₂Trp containing proteins in SHRSP – possible relation to hypertension, The16th International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Vancouver, Canada, July 17-21, 2016.
- 3) Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Iizumi K, Kimura U, Takamori K, Ogawa H, Yamakura F, Tryptophan nitration induced protein dysfunction in atopic dermatitis, Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology 2015, Atlanta, Georgia, USA, May 6-9, 2015
- 4) Yamakura F, Nitration of tryptophan residues in proteins: Important roles in some diseases, 2015 International Society For Tryptophan Research Conference, Van Andel Institute, Grand Rapids, MI, Sep16~18,
- 5) 川崎広明、池田雅彦、酒居一雄、重永綾子、飯泉恭一、宇田宗弘、馬場猛、高森建二、山倉文幸、脳卒中易発性高血圧自然発症ラット SHR-SP での 6-ニトロトリプトファン生成～タンパク質機能傷害と病態形成の関連性の解明～
第14回日本NO学会学術集会、佐賀、2014年5月

[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

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山倉 文幸 (YAMAKURA, Fumiyuki)
順天堂大学・国際教養学部・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

飯泉 恭一 (IIZUMI, Kyouichi)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・助手
研究者番号：30439351