

2022年度北陸大学特別研究助成【 奨励課題研究 】 報告書

代表者	所属	薬学部	職位	講師	氏名	池田 啓一
-----	----	-----	----	----	----	-------

研究課題名	ニトロ化ストレスにより修飾されたインドール環含有トリプトファン代謝物の健康影響
-------	---

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

研究成果の概要

本研究では、インドール骨格を有するトリプトファン（Trp）代謝物に特有の紫外吸収や蛍光、また、Trpの酸化やニトロ化による特有の可視吸収に注目し、Trp代謝物とペルオキシナイトライト（ONOO⁻）との反応による蛍光および紫外-可視吸収スペクトルの変化から、反応性の違いを解析し生体内抗酸化物質としての可能性が示唆された。逆相系前処理カラムにより、ONOO⁻分解物の硝酸・亜硝酸を脱塩するとともに、ニトロ化物を含む画分を得ることができた。インドール骨格を有しないTrp代謝物のキヌレニン（Kyn）はJurkat T細胞に対し細胞走化性を著しく抑制するが、Kynがアリルハイドロカーボン受容体（AhR）を介して、何らかの遺伝子発現をON/OFFしていることを示唆する結果が得られた。

研究目的

生体内物質のニトロ化は、炎症生疾患、神経変性疾患、がんや虚血-再灌流などの際に発生する一酸化窒素(NO)とスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻)に由来するペルオキシナイトライト(ONOO⁻)やNO₂といった活性窒素種によって、芳香族環や二重結合を持つタンパク質、アミノ酸、脂質、ヌクレオチドなどの生体分子に起こる。活性窒素種の過剰発生は、各組織に酸化やニトロ化による酸化傷害を起こす。特にニトロ化については、活性窒素種によってのみ起こるため、活性窒素種のバイオマーカーとして、多く用いられてきた。タンパク質やアミノ酸では、チロシン（Tyr）やトリプトファン（Trp）がニトロ化のターゲットとなっており、特に、タンパク質中のニトロチロシン(3-NO₂Tyr)は、多くの疾患部位において検出されている[1][2][3]。申請者は、活性窒素種による新規ニトロ化アミノ酸残基として、6-ニトロトリプトファン(6-NO₂Trp)を見いだした[4][5]。今まで、タンパク質中のTrp残基の生体内ニトロ化反応による機能変化について、申請者らが独自に開発した6-NO₂Trpの抗体を用いて、M2ピルビン酸キナーゼ（PK）など複数のタンパク質中に存在するTrp残基のうち、他の分子との相互作用に関連するTrp残基がニトロ化されることから、複数のタンパク質における特異的Trp残基のニトロ化が他の分子との相互作用に何らかの影響を与える可能性を見出した[6][7]。相互作用に関与するTrp残基が保存されている、ウサギ筋肉PKに対する活性への影響を調べたところ、ONOO⁻添加量依存的な活性の低下が見られている[8]。

遊離Trpについても同様に、主要なニトロ化物として6-NO₂Trpが得られ、その他酸化生成物も得られている[9][10]。活性窒素種によるニトロ化は、芳香族や二重結合を持つ生体分子がターゲットとなりうることで、また、セロトニンがONOO⁻消去能を持つこと[11]などから、遊離Trpと同様にインドール環を持つTrp代謝物も活性窒素種によるニトロ化のターゲットになると考えた。また、先行実験では、予備的な実験として、ONOO⁻作用後のセロトニンやトリプタミンなどでは、ニトロ化物を含むと推測される吸収スペクトルが得られた。前処理法について、また、機能面については、Trpのニトロ化物である6-NO₂Trpは、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）の酵素反応阻害を介して免疫寛容に寄与する[12][13]。また、IFN- γ 刺激によるヒト類表皮細胞株A431に誘導されるIDOのmRNAの発現量がTrpに比べ増強される[14]。安全性については、6-NO₂Trpが変異原性を持たないことを確認している[15]。以上のように、活性窒素種によるTrp代謝物のニトロ化と機能変化については、いくつか解析されているが不明な点が多い。われわれは、インドール環を有するTrp代謝物のうち、これらのONOO⁻に対する生体内抗酸化物質としての可能性を知ること及びTrp代謝物の機能変化を解析を目指し、今まで解析していなかったメラトニン、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）を含めたTrp代謝物のONOO⁻との反応性の再検討を行うと共に、この際に生ずるTrp代謝物の酸化・ニトロ化混合物より、培養細胞でのアッセイ系に用いるためのニトロ化されたTrp代謝物の調製を反応後の脱塩過程における亜硝酸による副反応に注意しながら行った。

また、インドール環を有するニトロ化Trp代謝物の培養細胞への影響について機能解析を行うにあたり、先行して研究が進んでいるインドール環を有しないTrp代謝物であるキヌレニン（Kyn）の培養細胞への影響が参考になる。これまでに、T細胞のモデル細胞であるJurkat T細胞は、Kyn処理によって細胞走化性を著しく抑制されることを見出してきた。しかし、Kyn処理は、細胞死を誘起せず、増殖停止も起こさない事を明らかにした。この現象を別の観点から確認する為にFアクチンに特異的に結合するファロイジンを細胞あたりのFアクチン量をFACSで測定した。

研究の方法

＜ONOO-とTrp代謝物との反応＞ 本研究では、Trp代謝物として、Trp、トリプタミン、インドール3-酢酸、5-ヒドロキシトリプトファン、セロトニン、メラトニン、5-HIAAを用いた。Trp代謝物に、最終濃度が1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0 mMになるまでONOO-を0.6mMずつ逐次加えて37℃で反応させる操作を繰り返した。対照群として、Trp代謝物を含まない溶液中に6.0 mMのONOO-を添加し37℃で分解後、Trp代謝物を添加し反応させた。

＜Trp代謝物の抗酸化物質としての可能性＞ 各Trp代謝物について、各濃度のONOO-との反応後の混合物を①可視-紫外吸収スペクトル、②蛍光スペクトルを測定し、各スペクトルのONOO-濃度による変化を解析した。

＜反応混合物からのニトロ化物の調製＞ ONOO-とTrp代謝物との反応で得られた酸化・ニトロ化混合物およびONOO-分解物の硝酸・亜硝酸について、Sep-pak C18（逆相系前処理用カラム）を用いて、素通り画分、精製水、メタノールの順に溶出させ、分取した各画分の紫外-可視吸収スペクトルを確認した。

＜Kynの培養細胞に対する影響＞ Jurkat T 細胞のケモカイン SDF-1α (CXCL12) に対する走化性をEZ-TAXIScan (ECI, Inc.) ならびにケモタキセル（クラボウ）を用いたボイデンチャンバー法で解析した。更にJurkat T 細胞をF-アクチン特異的蛍光ファロイジンで染色、フローサイトメーターFACSCalibur で細胞あたりの蛍光量を測定し、SDF-1α による蛍光量の増加に対するKyn処理の効果を解析した。

研究成果

＜Trp代謝物の抗酸化物質としての可能性＞ 生体内を想定し、0.6 mMずつONOO-を添加し、各Trp代謝物と反応させた。蛍光スペクトルにおける極大波長の蛍光強度は、ONOO-の添加に伴い減少し、6.0mMにおいては、（励起波長280nmによる）350nmの蛍光波長の蛍光強度は、ほぼ全て消失した。紫外-可視吸収スペクトルについて、Trp、トリプタミンへのONOO-添加量の増加に伴い、酸化物（350nm）及びニトロ化物（400nm）に特有な吸収の増加が見られた。5-OHTrpやセロトニンとの反応では、それらが長波長側へ延長したスペクトルが得られた。3-インドール酢酸やメラトニンとの反応では、400nmの吸収の増加はTrpに比べ少なかった。ONOO-とインドール骨格を有するTrp代謝物の反応性から生体内抗酸化物質としての可能性、活性窒素種との反応の特徴であるニトロ化物の生成が予測された。

＜反応混合物からのニトロ化物の調製＞ ONOO-とTrp代謝物との反応で得られた酸化・ニトロ化混合物について、Sep-pak C18（逆相系前処理用カラム）を用いて、分取した各画分の紫外-可視吸収スペクトルを確認した。疎水性やスペクトルから判断し、メタノール画分のみを回収しTrp代謝物のニトロ化混合物とし、培養細胞を用いる実験の試料として濃縮した。現在、そのうちの一部試料については、構造-機能解析に向けHPLCを用いてニトロ化物の分離精製を行なっている。

＜Kynの培養細胞に対する影響＞ T細胞のモデル細胞であるJurkat T細胞に対するKyn処理後、Fアクチンに特異的に結合するファロイジンを用い細胞あたりのFアクチン量を測定したところ、ファロイジンによる細胞当たりの蛍光量（つまり重合したアクチン量）は、明らかに抑制された。次にKynの真の受容体であるアリルハイドロカーボン受容体(AhR)のアンタゴニストCH223191 が、Kyn効果を抑制するかどうかを解析した。細胞走化性、重合アクチンの促進ともに、CH223191処理によって、Kyn効果が打ち消された。これらの結果は、KynがAhRを介して、何らかの遺伝子発現をON/OFFしていることを示唆している。

＜引用文献＞ [1] Yamakura F, Ikedo K, Nitric Oxide, 14, 152-161, 2006 [2] 古川 他 (池田)、順天堂医学, 54, 308-317, 2008 [3] Pacher P et al., Physiol Rev, 87, 315-424, 2007 [4] 池田 他、健康創造研究会誌, 3 (1), 56-64, 2004 [5] Yamakura F et al., (Ikedo K) , J Biochem, 138, 57-69, 2005 [6] Ikedo K et al., Nitric Oxide, 16, 18-28, 2007 [7] Kawasaki H, Ikedo K et al., Free Radic Biol Med, 50 (3), 419-427, 2011 [8]池田 他、日本トリプトファン研究会第40回学術集会、発表番号[G9], 2022 [9] 山岸 他 (池田)、学苑・生活科学紀要, 770, 84-88, 2004 [10] 山岸 他 (池田)、学苑・生活科学紀要, 782, 53-56, 2005 [11] 松本 他 (池田)、学苑・生活科学紀要, 818, 35-39, 2008 [12] Southan MD et al. (S Toné), Med Chem Res, 5, 343-352, 1996 [13] Munn DA et al., J Exp Med, 189, 1363-1372, 1999 [14] 岡本 他(刀祢)、川崎医会誌一般教, 35, 1-9, 2009 [15] 池田 他、学苑・生活科学紀要, 950, 36-43, 2019

主な発表論文等

＜論文等＞ [1] M Hatsuda, et al. (K Ikeda), Effects of neutron radiation as cosmic radiation on food resources, J Neutron Res, 25, 41-46, 2023 [2] 池田啓一、学術集会開催報告 日本トリプトファン研究会第40回学術集会、北陸大学紀要, 53, 229-230, 2022 <学会> [3] M Hatsuda et al. (K Ikeda), Effects of neutron radiation on food in deep space environments 4rd International Symposium on Advanced Measurement, Analysis and Control for Energy and Environment International Symposium on Advance Technology for Space Applications International Symposium on LIBS for Extreme Applications AMACEE2022/ATSA2022/LEA2022 Joint International Conference-WEB, Dec. 15th-16th, 2022[4]中内ら (刀祢, 池田) インドール骨格を有するトリプトファン代謝物のペルオキシナイトライトとの反応性～スペクトル測定からの検討～、日本生化学会北陸支部第41回大会、2023,6、[5]川崎ら (池田) アトピー性皮膚炎モデルマウス C.KOR/ StmSlc-Traf3ip2adjm の皮膚における 6-ニトロトリプトファン生成、日本トリプトファン研究会第 41 回学術集会、2022.12、[6]中川ら (刀祢, 池田) インドール環含有トリプトファン代謝物はペルオキシナイトライトに対する生体内抗酸化物質となり得るのか？～スペクトル測定からの検討～、日本トリプトファン研究会第 41 回学術集会、2022.12、[7]鳥谷部ら (刀祢, 池田) 活性窒素種によるトリプトファン代謝物のニトロ化と副反応を回避する前処理法の検討、日本トリプトファン研究会第 41 回学術集会、2022.12、[8] 池田啓一ら (刀祢) インドール環含有トリプトファン代謝物の生体内抗酸化物質としての可能性～スペクトル測定で見るペルオキシナイトライトとの反応性～、第23回 日本補完代替医療学会学術集会、2022.11、[9] M Hatsuda et al. (K Ikeda), The modification of meats with a cosmic neutron radiation, Nutrition and Food 6, 2022.5

組 織

分担・協力者	氏名	所属	職位	役割
分担	刀祢重信	東京電機大学	客員教授	ニトロ化Trp代謝物の細胞機能への影響