

2020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・講師	氏名	池田啓一
-----	----	--------	----	------

研究課題名	『活性窒素種によりニトロ化されたトリプトファン代謝物は健康に影響を及ぼすか？』
-------	---

交付額	200,000	円
-----	---------	---

研究成果の概要

ペルオキシナイトライトなどの活性窒素種による生体内での生体物質ニトロ化は、炎症性疾患を中心とした様々な疾患と関連する。申請者は、活性窒素種によるタンパク質残基やトリプトファン代謝物のニトロ化と機能変化について調べた。タンパク質については、解糖系の代謝酵素であるピルビン酸キナーゼについて、ペルオキシナイトライトの作用により活性が低下することを見出した。トリプトファン代謝物については、ニトロ化物の分離を行う過程において、活性窒素種の分解物がpHなどの適切な取り扱いや素早い除去により、反応後の副反応を防ぐことが重要と考えた。今回は、セロトニンやインドール酢酸など、代謝物ごとに適切な活性窒素種の分解物の除去方法を見出し、その後の適切な生成物の分離を可能にすることができた。

研究目的

生体内物質のニトロ化は、炎症や虚血 - 再灌流の際に発生する一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシド (O_2^-) に由来するペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) や NO_2 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、各組織にニトロ化による酸化傷害を起こす。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、タンパク質中のTyr残基のニトロ化物であるニトロチロシン ($3-NO_2Tyr$) は、炎症性疾患、脳神経系疾患、がんなど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 ($6-NO_2Trp$) 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 $6-NO_2Trp$ の抗体を用いて、細胞やその祖抽出液に対する網羅的解析により進め、ピルビン酸キナーゼなどタンパク質中の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]。今回は、 $ONOO^-$ のピルビン酸キナーゼに対する活性への影響を調べた。

遊離Trpについても同様に、主要なニトロ化物として $6-NO_2Trp$ が得られ、その他酸化生成物も得られている [8] [9]。活性窒素種によるニトロ化は、Tyr, Trpだけでなく、芳香族や二重結合を持つ生体分子がターゲットとなること、また、セロトニンが $ONOO^-$ 消去能を持つこと [10] 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、 $ONOO^-$ 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 (池田、未発表)。機能面については、Trpのニトロ化物である $6-NO_2Trp$ 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 [11] [12]。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 [13]。安全性については、 $6-NO_2Trp$ が変異原性を持たないことを確認している [14]。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。反応系の統一性がなく、分離中の副反応防止について、検討していないものがほとんどである。今回は、統一した反応条件において、 $ONOO^-$ とインドール環を含むTrp代謝物とを反応させ、副反応が起こらない条件での脱塩後に分離を行った。

研究の方法

< $ONOO^-$ によるピルビン酸キナーゼのニトロ化と活性測定 > 150 mM リン酸バッファー (pH7.4)、0.1 mM ジエチレントリアミン五酢酸、25 mM 炭酸水素ナトリウムを含む溶液中にピルビン酸キナーゼを溶解させた。そこに最終濃度が1.2, 2.4, 3.6 mMになるまで $ONOO^-$ を逐次加えて37 °Cで反応させた。その後、限外濾過による脱塩・濃縮を行い、その後の実験に用いた。活性測定は、NADH-乳酸デヒドロゲナーゼ共役法 (NADH-LDH法) [15] により行った。

< $ONOO^-$ とTrp代謝物との反応 > Trp代謝物に、最終濃度が3.6 mMになるまで $ONOO^-$ を逐次加えて37 °C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3.6 mMの $ONOO^-$ を添加し37 °Cで分解後、Trp代謝物を添加し反応させた。

< 前処理法の検討 > ①C18カラム：逆相系前処理用カラムに $ONOO^-$ とTrp代謝物との反応後の混合物を通し、素通り画分、精製水、メタノールの順に溶出した。回収した各画分の紫外-可視吸収スペクトルにより成分を確認した。②陽イオン交換カラム：陽イオン交換樹脂を用いて、陽イオン交換樹脂を充填させたカラムに、 $ONOO^-$ セロトニンを添加した。素通り画分、精製水、メタノールの順に溶出し、回収した各画分の紫外-可視吸収スペクトルを確認した。これは、文献 [16] を参考に行った。③薄層クロマトグラフィー： $ONOO^-$ と反応させたインドール-3-酢酸 (IAA) を原点に添加後、100%メタノールにより展開した。終了後、エールリッヒ試薬により、生成物の展開領域を確認した。次に、同様に展開させたあと、発色をさせず、該当のRf値の部分を掻き取り回収・抽出した。

< 逆相HPLCによる分離 > 0.1 %ギ酸 (A液)、0.1 %ギ酸 / 90 %アセトニトリル (B液) を用いて、B液の濃度勾配による溶出で分離した。主要なピークについて紫外-可視吸収スペクトルを測定した。

研究成果

<ONOO⁻によるピルビン酸キナーゼのニトロ化と活性> ピルビン酸キナーゼは、解糖系の最終段階の酵素であり、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) から、多くの代謝物の分岐点となるピルビン酸を生成する酵素である。以前行った研究において、ラット由来のPC12細胞や細胞の抽出物に対し、ONOO⁻を作用させると、M2ピルビン酸キナーゼのTrp482がニトロ化されることを見出した[6] [7]。この部位に、ピルビン酸よりも解糖系の上流に存在するフルクトース1,6-ビスリン酸が結合することにより、ピルビン酸キナーゼのフィードフォワードアクティベーションが起こる。そこで、今回は、哺乳類の中で、Trp482を含む重要なアミノ酸残基の配列が保存されていることを踏まえ、既製品であるウサギ筋肉ピルビン酸キナーゼを用いて、ONOO⁻による活性低下の有無を解析した。

ピルビン酸キナーゼの酵素反応により生じたピルビン酸を簡便かつ直接的に可視化することは難しいこと、また、比較的安価な方法を採用する必要があることから、今回の活性測定は、NADH-LDH法を採用した。NADH-LDH法では、ピルビン酸キナーゼの反応系とLDHの反応系を共存させ、2段階の反応で行われる。第1段階として、ピルビン酸キナーゼが触媒するPEPからピルビン酸が生じる。第2段階として、LDHによりピルビン酸からL-乳酸を生じさせる際に消費されるNADHの340 nmの吸光度の減少を利用して、活性を可視化することができる。

(第1段階) ピルビン酸キナーゼによる酵素反応： $PEP + ADP \rightarrow \text{ピルビン酸} + ATP$

(第2段階) LDHによる酵素反応： $\text{ピルビン酸} + NADH + H^+ \rightarrow L\text{-乳酸} + NAD^+$

NADH-LDH法[15]で使われるNADHは酸性では分解しやすいため、多種類の試薬の用時調製や1回ずつの活性測定毎にNADHの超純水への溶解など、時間がかかり測定が安定しない要因が多くあった。本研究ではNADHのみを0.1 M NaOH中で溶かし、後から添加することで活性測定前のNADHの分解を避け、反応を安定化させた。その上で、活性測定のためのピルビン酸キナーゼの適正濃度を設定し、活性測定法を確立することができた。実際に、ONOO⁻と反応させたウサギ筋肉ピルビン酸キナーゼの活性測定では、作用させるONOO⁻の量に従って、大きな活性の減少が見られた。ONOO⁻によるピルビン酸キナーゼの活性低下は、生体防御反応としてのONOO⁻によるがん細胞不活化の機構の一つかもしれない。

<ONOO⁻を作用させたトリプトファン代謝物からのONOO⁻分解物の除去> Trp代謝物にONOO⁻を作用させた場合、亜硝酸などの分解物の存在により、ニトロソ化などの副反応が起こることが考えられるため、逆相HPLCで用いられる酸性条件での生成物の分離が困難になっている。また、反応条件よりpHを変化させた場合でも、副反応が起こる可能性がある。そこで、ONOO⁻分解物の除去のため、反応後のTrp代謝物からの脱塩の方法について検討した。最初に、水-メタノール系での逆相系カラムを用いての脱塩を試みたが、多くの化合物が、塩と近い溶出位置での溶出が見られ、分離が困難であった。そこで、置換基として、アミノ基を持つものとそうでないものに注目して、脱塩を試みた。

アミノ基を持つTrp代謝物として、セロトニンが挙げられるが、原理的には亜硝酸や亜硝酸イオンが陽電荷を持たないこと、セロトニンのアミノ基が反応液のpH 7.4付近で陽電荷を持つことに注目し、陽イオン交換樹脂により分離可能と考えた。実際に文献[16]を応用し今回の系に適用し分離を試みたところ、ONOO⁻分解物は捕捉されず、セロトニンやその酸化物・ニトロ化物が1N HClにて溶出されることが、各画分の紫外-可視吸収スペクトルにより確認された。アミノ基を持つ他のTrp代謝物についても適用できる可能性がある。

一方、アミノ基を持たないTrp代謝物については、比較的取り扱いやすいインドール-3-酢酸を用いた。反応液のpH 7.4付近では、分子型の構造を取るため、メタノールを用いてのTLCによる分離を試み、該当部分を抽出後、逆相HPLCにより、TLCによる前処理を行わなかったパターンとの比較から、塩濃度が大幅に減少していることと、副反応が抑えられていることが確認できた。

文献[17]は、本研究と反応条件の違う炭酸ガス非存在下で、4-ニトロセロトニンの生成を確認している。文献[18]は、メラトニンとの反応では、炭酸ガス存在下で、安定な生成物としてニトロメラトニンを生じないと報告しているが、脱塩前に酸性条件で逆相HPLCにかけているため、分離中に亜硝酸の作用による副反応を起こしている可能性が高い。今後は、統一された反応系を用いて、脱塩により副反応を防ぐことも可能になったので、ONOO⁻と各Trp代謝物との反応による生成物の単離・同定と、機能解析を進め、健康影響について明らかにしていきたい。

[1] Yamakura F, Ikeda K, *Nitric Oxide*, 14, 152-161, 2006 [2] 古川寛 他 (池田啓一)、*順天堂医学*, 54, 308-317, 2008 [3] Pacher P et al., *Physiol Rev*, 87, 315-424, 2007 [4] 池田啓一 他、*健康創造研究会誌*, 3 (1), 56-64, 2004 [5] Yamakura F et al., (Ikeda K), *J Biochem*, 138, 57-69, 2005 [6] Ikeda K et al., *Nitric Oxide*, 16, 18-28, 2007 [7] Kawasaki H, Ikeda K et al., *Free Radic Biol Med*, 50 (3), 419-427, 2011 [8] 山岸美穂 他 (池田啓一)、*学苑・生活科学紀要*, 770, 84-88, 2004 [9] 山岸美穂 他 (池田啓一)、*学苑・生活科学紀要*, 782, 53-56, 2005 [10] 松本孝 他 (池田啓一)、*学苑・生活科学紀要*, 818, 35-39, 2008 [11] Southan MD et al., *Med Chem Res*, 5, 343-352, 1996 [12] Munn DA et al., *J Exp Med*, 189, 1363-1372, 1999 [13] 岡本ら、*川崎医学会誌一般教*, 35, 1-9, 2009 [14] 池田啓一 他、*学苑・生活科学紀要*, 950, 36-43, 2019 [15] Bucher T, Pfluderer G, *Method Enzymol*, 1, 435-440, 1955 [16] Ogasahara S et al., *J Chromatogr*, 180, 119-126, 1979 [17] Blanchard B et al., *Nitric Oxide*, 1, 442-452, 1997 [18] Zhang H et al., *Biochem Biophys Res Comm*, 251, 83-87, 1998

主な発表論文等

【研究費】初田真知子、川崎広明、山倉文幸、鎌田弥生、黒河千恵、大竹淑恵、竹谷篤、高梨宇宙、若林泰生、松本(重永)綾子、池田啓一、家崎貴文、長岡功、「食物資源への宇宙放射線の影響」順天堂大学保健医療学部2020年度共同研究・奨励研究成果報告書(2021.3)

【学会発表】初田真知子、川崎広明、山倉文幸、鎌田弥生、黒河千恵、大竹淑恵、竹谷篤、高梨宇宙、若林泰生、松本(重永)綾子、池田啓一、家崎貴文、長岡功、宇宙環境における食物への中性子線の影響、日本物理学会2021年秋季大会 (2021.9)

Risa Nishiyama, Hiroaki Kawasaki, Ayako Shigenaga, Kyoichi Iizumi, Keiichi Ikeda, Takeshi Baba, Takashi Matsumoto and Fumiya Yamakura, Detection of tryptophan nitration in food product as a step towards elucidating physiological effects of tryptophan nitration, 第93回日本生化学会大会 (ポスターP495) (2020.9)