

〔研究ノート〕

# ペルオキシナイトライトによる トリプトファンの反応生成物

山岸 美穂・松本 孝・池田 啓一・山倉 文幸

Reaction Products of Tryptophan by Peroxynitrite Treatment

Miho YAMAGISHI, Takashi MATSUMOTO,  
Keiichi IKEDA and Fumiyuki YAMAKURA

It is well known that tyrosine residues in proteins are the target of peroxynitrite to form nitrotyrosine residues. On the other hand, it became clear that tryptophan residues in proteins are the target of peroxynitrite to form tryptophan derivatives. However, the reaction products of tryptophan with peroxynitrite are not so clear.

In our previous investigation, we reported that tryptophan was easier to react with peroxynitrite than tyrosine, and that a lot of unknown reaction products had been detected in the reaction. In the reaction of tryptophan with peroxynitrite, it was reported that the reaction is complicated and formed some unstable products, *N*<sup>1</sup>-nitro- and *N*<sup>1</sup>-nitroso derivatives.

In this study, we experimented on the reaction of the tryptophan by peroxynitrite. As a result, kynurenine, 7-nitrotryptophan, 6-nitrotryptophan, 4-nitrotryptophan and 5-nitrotryptophan were identified. And two other unstable products which were not *N*<sup>1</sup>-nitro- and *N*<sup>1</sup>-nitroso derivatives were found.

*Key words:* tryptophan (トリプトファン), peroxynitrite (ペルオキシナイトライト),  
reactive nitrogen species (活性窒素種), reaction product (反応生成物), identification (同定)

## 1 序 論

活性窒素種の一つであるペルオキシナイトライトは一酸化窒素とスーパーオキシドが直接反応して生成する化合物で、非常に高い酸化ならびにニトロ化活性を有している。生体内でもペルオキシナイトライトの生成が知られ、様々な生体物質の酸化、ニトロ化が確認されている。特にタンパク質のチロシンのニトロ化については、これを検出する試薬も開発され、病気の発症との関連が注目されている<sup>1~4)</sup>。

一方、タンパク質中のトリプトファン残基もペルオキシナイトライトでニトロ化されることが知られているが<sup>5~8)</sup>、多くのタンパク質におけるアミノ

酸組成からわかるとおり、トリプトファン残基の含有量はチロシンのそれに比べ少なく、研究はこれからという段階にある。酵素タンパク質中のトリプトファン残基は、そのインドール環に基づく相互作用により、酵素の基質結合部位の形成や高次構造の維持に重要な役割を果たしているとも考えられている。

前報では<sup>9)</sup>、遊離のチロシン、トリプトファンのペルオキシナイトライトに対する反応性を異なるpH条件下で比較し、どちらのアミノ酸がペルオキシナイトライトの影響を受けやすいかについて検討した。その結果、中性付近の生理的条件下で両アミノ酸のニトロ化は最も起こりやすく、3-ニトロチロシンよりも、6-ニトロトリプトファンの方が生

成しやすいということがわかった。しかし、6-ニトロトリプトファンの生成量は反応したトリプトファンの13.2%で予想外に少なく6-ニトロトリプトファン以外にも未確認の生成物が多く認められた。トリプトファンの反応生成物には不安定なニトロソ、ニトロシル化合物も生成するという報告もあることから<sup>10)</sup>、本研究ではトリプトファンとペルオキシナイトライトを反応させた後、逆相 HPLC で分離し、生成物の同定およびニトロソ化物、ニトロシル化合物の確認を行った。

## 2 試薬と実験方法

試薬類は市販のできるだけ高純度のものを使用した。ペルオキシナイトライト溶液は(株)同仁化学研究所から、L-トリプトファンは和光純薬工業(株)から購入した。

トリプトファンとペルオキシナイトライトの反応の溶液組成は、1.5ml容の容器に、最終濃度でトリプトファンは1 mM、ジエチレントリアミン-*N,N,N',N',N''*-五酢酸(DTPA)は0.1mM、炭酸水素ナトリウムは25mM、リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)は200mMになるように加え、全量を1.0mlとした。これを37℃に保った後、1.2mM分のペルオキシナイトライトをすばやく加え、良く混合し37℃に2分間放置した。放置後、再度同量のペルオキシナイトライトを加え、最終濃度を2.4mMにした。トリプトファンを含まない上記溶液に同量のペルオキシナイトライトを作用させた2分後、既定量のトリプトファンを加えた溶液をコントロールとした。

反応生成物の分離分析は高速液体クロマトグラフィー((株)日立製作所製 LC-6100)にフォトダイオードアレー検出器(日本分光(株)製 PD-910)を接続し、Capcell-Pak C8 SG300(4.6×250mm,(株)資生堂製)の逆相系カラムで行った。試料溶液として上記の要領で反応させた直後の溶液、反応させてから8~9日間-20℃で凍結保存した溶液をそれぞれ20 $\mu$ l、直接注入した。カラムからの溶離は、流速0.5ml/min、0.1%ギ酸水溶液と0.1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液の二液の混合(50分間でアセトニトリル濃度が0%から45%となるリニアグラジエント)で

行った。

## 3 結果および考察

1 mMトリプトファンを前述した条件下でペルオキシナイトライトと反応させ、その反応混液の逆相 HPLC の結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 の (a) は、トリプトファンとペルオキシナイトライトを反応させてからただちに逆相 HPLC で分離したもので、Fig. 1 の (b) はトリプトファンとペルオキシナイトライトを反応させてから数日後に逆相 HPLC で分離したものである。また、pH7.4のクロマト上でピーク A,B,C,D,E,F,G,H の可視・紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。Fig. 2 の (a) はピーク A,B,C,D の可視・紫外吸収スペクトルで、Fig. 2 の (b) はピーク E,F,G,H の可視・紫外吸収スペクトルである。ピーク C は実際の10分の1にしてあるので、C' とした。

ピーク A,B,C,D,E,F は反応直後と数日後の違いはほとんど見られなかった。しかしピーク G,H は反応直後に逆相 HPLC で分離した時に検出され、反応させてから8~9日後の溶液を逆相 HPLC で分離した時には検出されなかった。この G,H のピークは、不安定なものと考えられる。ペルオキシナイトライトによるニトロソ化物、ニトロシル化物は、不安定であると言われており、このピークは、はじめはニトロソ化物、ニトロシル化物であると考えたが、Sala ら<sup>10)</sup> の報告によると、ニトロソ化物の吸収極大は335nmであり、ニトロシル化物の吸収極大は332nmであるが、吸収スペクトル G,H の吸収極大は、両方とも290nm付近にあることから、ニトロソ化物、ニトロシル化物ではないと推定した。しかし、これが何であるのかということは、現段階ではわからない。その為今後、ペルオキシナイトライトによる、ニトロソ化物、ニトロシル化物の同定や吸収スペクトル G,H の同定を行う必要がある。

吸収スペクトル A は、吸収極大は360nm付近にあった。キヌレニンの標準試料を用いて、逆相 HPLC で分離を行った場合にも相当する溶出時間にピークが認められることや、吸収スペクトルも酷似していることから、吸収スペクトル A は、キヌレ

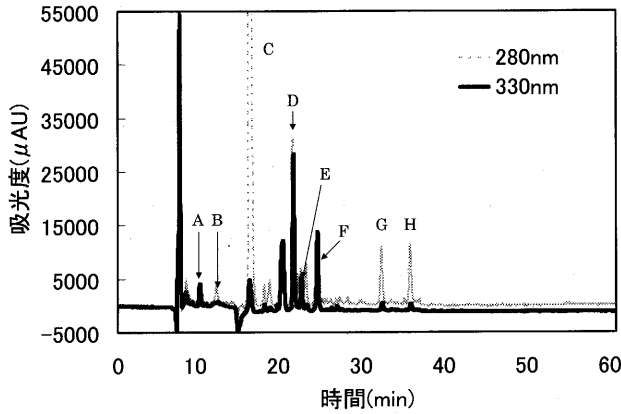


Fig. 1 (a) 反応直後の反応生成物

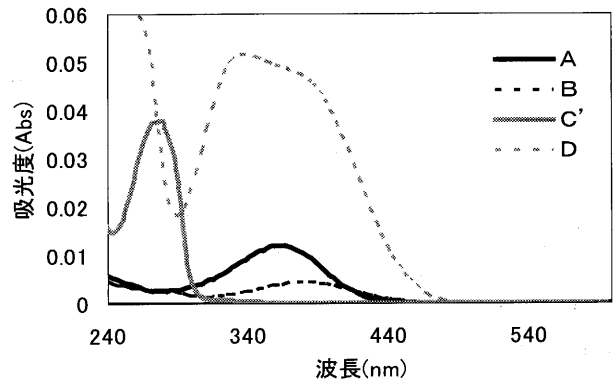


Fig. 2 (a) 反応生成物の可視・紫外吸収スペクトル

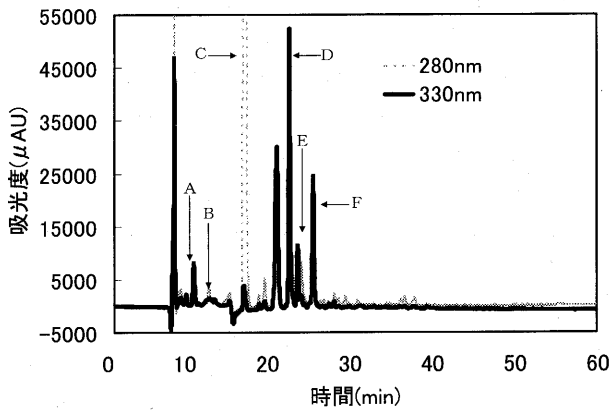


Fig. 1 (b) 反応させてから数日後の反応生成物

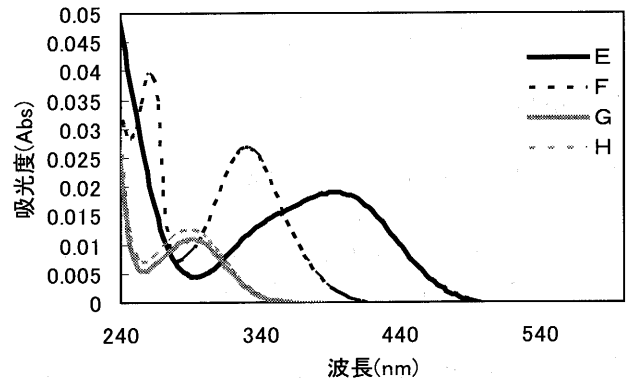


Fig. 2 (b) 反応生成物の可視・紫外吸収スペクトル

ニンと考えられる。吸収スペクトル B は、吸収極大は 380nm 付近にあった。Berti ら<sup>11)</sup> の報告によると、7-ニトロトリプトファンの吸収極大は 380nm 付近にある。吸収スペクトルも吸収スペクトル B と酷似していることから、吸収スペクトル B は 7-ニトロトリプトファンと考えられる。吸収スペクトル C は、トリプトファンの標準試料を用いて、逆相 HPLC で分離を行った場合にも相当する溶出時間にピークが認められることや、吸収スペクトルも酷似していることから、トリプトファンと考えられる。吸収スペクトル D は、吸収極大は 380nm 付近にあった。特徴として 330nm 付近に吸収の肩があった。6-ニトロトリプトファンの標準試料を用いて、逆相 HPLC で分離を行った場合にも相当する溶出時間にピークが認められることや、吸収スペクトルも酷似していることから、6-ニトロトリプトファ

ンと考えられる。吸収スペクトル E は、吸収極大は 400nm 付近にあった。Herold ら<sup>12)</sup> や Sala ら<sup>10)</sup> や Berti ら<sup>11)</sup> の報告によると、4-ニトロトリプトファンの吸収極大は 400nm 付近にある。吸収スペクトルも吸収スペクトル E と酷似していることから、吸収スペクトル E は 4-ニトロトリプトファンと考えられる。吸収スペクトル F は、吸収極大は 330nm 付近にあった。Susanna ら<sup>12)</sup> や Berti ら<sup>11)</sup> の報告によると 5-ニトロトリプトファンの吸収極大は 330nm 付近にある。吸収スペクトルも吸収スペクトル F と酷似していることから、吸収スペクトル F は 5-ニトロトリプトファンと考えられる。

## 4 要約

トリプトファンとペルオキシナイトライトを反応させてからすぐに逆相 HPLC で分離させ、ニトロソ化物、ニトロシル化物等不安定な物質を同定することや、前報でトリプトファンの方がチロシンよりも未確認の生成物が多く検出されたということから、これらの未確認生成物を同定することを目的として、実験を進めた。その結果、キヌレニン、7-ニトロトリプトファン、6-ニトロトリプトファン、4-ニトロトリプトファン、5-ニトロトリプトファンが確認された。また、反応直後と数日後の比較から、報告にあるニトロソ化物、ニトロシル化物以外の、不安定な生成物が確認された。

## 5 引用文献

- 1) Bian K, Davis K, Kuret J, Binder L and Murad F: Nitrotyrosine formation with endotoxin-induced kidney injury detected by immunohistochemistry, *Am. J. Physiol.*, 277 (Renal Physiol.46): F33-F40, 1999
- 2) Ischiropoulos H: Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305: 776-783, 2003
- 3) Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, Hayakawa N and Kajiyama G: Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1411-1415, 1999
- 4) Smith M.A, Harris P.L.R, Sayne L.M, Beckman J.S and Perry G: Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 17: 2653-2657, 1997
- 5) Alverz B, Rubbo H, Kirk H, Barnes S, Freeman B.A and Radi R: Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 390-396, 1996
- 6) Padmaja S, Ramazenian M.S, Bounds P.L and Koppenol W.H: Reaction of peroxynitrite with L-tryptophan, *Redox Rep.*, 2: 173-177, 1996
- 7) Kato Y, Kawakishi S, Aoki T, Itakura K and Osawa T: Oxidative modification of tryptophan residues exposed to peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 82-84, 1997
- 8) Yamakura F, Matsumoto T, Fujimura T, Taka H, Murayama K and Uchida K: Modification of a single tryptophan residue in human Cu, Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1548: 38-46, 2001
- 9) 山岸美穂・松本孝・池田啓一・山倉文幸: 学苑, 770: 84-88, 2004
- 10) Sala A, Nicolis S, Roncone R, Casella L and Monzani E: Peroxidase catalyzed nitration of tryptophan derivatives: Mechanism, products and comparison with chemical nitrating agents. *Eur. J. Biochem.* 271, 2841-2852, 2004
- 11) Berti G, Da Settimo A and Segnini D: Studio spettrofotometrico dell'acidità di alcuni nitroderivati indolici. *Gazz. Chim. Ital.*, 90: 539-558, 1960
- 12) Herold S, Shivashankar K and Mehl M: Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. *Biochemistry*, 41: 13460-13472, 2002

(やまぎし みほ 生活科学科)

(まつもと たかし 生活機構研究科)

(いけだ けいいち 順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所)

(やまくら ふみゆき 順天堂大学医学部化学研究室)