

〔研究ノート〕

種々の生体物質のペルオキシナイトライト消去能

松本 孝・若林ゆう・池田啓一・山倉文幸

Evaluation of Biomolecules as Peroxynitrite Scavengers *in Vitro*

Takashi MATSUMOTO, Yuh WAKABAYASHI,
Keiichi IKEDA and Fumiyuki YAMAKURA

Peroxynitrite, which is formed from the reaction of superoxide radical and nitric oxide, can cause specific structural modifications in proteins such as the addition of a nitro group onto aromatic residues. These modifications can cause perturbations in the properties of the proteins, such as conformation, catalytic activity, susceptibility to proteolysis, and immunogenicity, resulting in several human diseases.

Finding a specific peroxynitrite scavenger is, therefore, of considerable importance. Accordingly, we assessed the scavenging ability of several biomolecules purchased from commercial sources on nitration of a protein by peroxynitrite at physiologic CO₂ condition *in vitro*. In sixteen molecules tested, reduced redox-cofactors, and polyphenol-compounds were effective scavengers against peroxynitrite-mediated protein nitration *in vitro* and one of these, epigallocatechine was the most effective. It was also noticed that tryptophan and serotonin creatinine sulfate possessed relatively high scavenging abilities against peroxynitrite-mediated protein nitration *in vitro*.

Key words: peroxynitrite scavenging abilities (ペルオキシナイトライト消去能), protein nitration (タンパク質のニトロ化), biomolecule (生体分子)

食品中に存在する抗酸化物質の摂取は、種々の病気の予防および治療においてますます重要になってきている。特に、ビタミンC、ビタミンE、カロテン、植物由来のフェノール化合物などは、活性酸素種を消去する食品成分として多くの研究がなされている。

一方、ペルオキシナイトライトは次の化学反応式で示されるように、活性酸素の一つであるスーパーオキシドラジカルと一酸化窒素から生体内で非酵素的に生成する活性窒素種のひとつである。



この物質はラジカルではないが生理的条件下での半減期が1~2秒で、二酸化炭素(CO₂)の存在下ではさらにその反応性は高まり、タンパク質を始めと

して核酸や脂質などを酸化、ニトロ化し、各種酵素活性を阻害あるいは活性化する^{1)~5)}。また、ミトコンドリア膜の傷害、呼吸鎖や酸化的リン酸化経路の傷害を通して病気の進行や神経細胞の死に関わっていると考えられる^{6),7)}。さらに、タンパク質中のチロシン残基のニトロ化が通常老化過程で増加することも報告されている^{8)~10)}。近年では、このタンパク質のニトロ化はタンパク質合成後のリン酸化やアデニル化のように酵素活性や機能等を変化させ、体内での様々な調節を担っていることも推察され、直接或いは間接的に生理的影響や老化と広く関連している可能性が考えられている。ペルオキシナイトライトを直接消去する酵素やニトロ化されたタンパク質を脱ニトロ化する酵素はその存在が示

唆されてはいるが、まだ確証には至っていない。现阶段ではペルオキシナイトライトは酵素活性を阻害する報告が多い^{1)~5)}。またヒトや動物の病理組織で多く認められるニトロチロシンは、タンパク質中のチロシン残基がニトロ化されて生じたものであり、これにペルオキシナイトライトが関与しているとの報告¹¹⁾もあることなどから、ペルオキシナイトライトが生体にとっての毒性的作用を持つと見る向きが多く、抗酸化物質の場合と同様、ペルオキシナイトライトの作用を特異的に抑制する物質の検索への期待は大きい。このような背景から、ペルオキシナイトライトの作用を抑制する食品成分・天然物質の検索も行われ、zingerone¹²⁾、flavonoids¹³⁾、sinapinic acid¹⁴⁾、anthocyanin¹⁵⁾、polyphenol¹⁶⁾等でその効果が報告されている。

ペルオキシナイトライト毒性消去能の評価測定には、ジヒドロローダミン 123 の酸化を蛍光測定する方法¹⁷⁾、エバンスブルー色素の退色を分光学的に測定する方法¹⁸⁾、ペルオキシナイトライトに依存したチロシンのニトロ化能の抑制率を HPLC を用いて分光学的に測定する方法¹³⁾、タンパク質とニトロチロシン抗体を用いた ELISA 分析¹⁹⁾、Western Blotting 分析^{12), 16), 20)}等があるが、ペルオキシナイトライトが直接タンパク質をニトロ化する能力の抑制能を分光学的に評価した報告はない。そこでこの報告では、重炭酸イオンの存在する生理的条件下で、ペルオキシナイトライトが牛血清アルブミンに及ぼす分光学的影響について検討し、その結果を用いて、生体関連低分子化合物による毒性消去能を検討した。

実験方法

試薬・試料

ウシ血清アルブミン (A-7906), epigallocatechine, quercetin, serotonin creatinine sulfate, ferulic acid, NAD, NADP は Sigma-Aldrich Japan (株) 製, ペルオキシナイトライト溶液は同仁化学 (株) 製, sinapinic acid, pyrroloquinoline quinine は 関東化学 (株) 製, epicatechin, glutathione (還元型), riboflavin は和光純薬工業 (株) 製, NADH,

NADPH はオリエンタル酵母 (株) 製を, その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。ペルオキシナイトライト処理したウシ血清アルブミンと低分子物質の分離には GE Healthcare Bio-Sciences (旧 Amersham Biosciences) (株) 製の PD-10 カラムを用いた。

ペルオキシナイトライトによるウシ血清アルブミンのニトロ化の濃度依存性

ペルオキシナイトライトとウシ血清アルブミンの反応はつぎに示す組成の溶液中で行った。ウシ血清アルブミン: 1 mg, ジエチルトリアミン五酢酸: 0.1 μ mol, 炭酸水素ナトリウム: 25 μ mol, リン酸緩衝液 (pH 7.4): 200 μ mol を含む水溶液 1 ml (溶液 A) を用意した。この溶液の 425 nm での吸光度を測定後, 5 分間 37°C に保持し, そこに約 100 mM ペルオキシナイトライト溶液を 1 回の添加で終濃度 0.33 mM になるように素早く添加混合し 0.33 mM ペルオキシナイトライト処理溶液とした。この溶液を 1 分間 37°C に保持した後, 再度 425 nm での吸光度を測定した。終濃度 0.67 mM, 1.00 mM ペルオキシナイトライト処理溶液に関しては同様の方法でさらに 1 回の添加で 0.333 mM ずつの増加になるよう 2 回および 3 回に分けてペルオキシナイトライトを添加した。ペルオキシナイトライトの添加による溶液の体積変化は無視した。

ペルオキシナイトライト消去能の測定

ペルオキシナイトライト消去能は溶液 A の蒸留水部分の一部を生体関連低分子物質の溶液に置き換え, 以下の方法で生体関連物質の有無に依る結果の違いから評価した。

溶液 A にさらに生体関連物質溶液 (後述) を添加 (サンプル) あるいは非添加下 (コントロール) で全体量を 1 ml とした。また, 生体関連物質自身がペルオキシナイトライトと反応し発色する可能性やウシ血清アルブミンとの相互作用を考慮して, ウシ血清アルブミンを添加していない溶液 A (全体量 0.90 ml) に生体関連物質を添加したもの (ブランク) を用意した。それぞれのペルオキシナイトライト処理は 0.33 mM ずつ, 3 回に分けて行い, ブランクに関し

ではペルオキシナイトライトを3回加えた2分後に規定量のウシ血清アルブミンを加えて、いずれもペルオキシナイトライト最終濃度を1 mMとした。反応後、サンプル、コントロール、ブランク各溶液の425 nmでの吸光度を測定後、これらをあらかじめ0.1 M 炭酸水素アンモニウムで平衡化してあるPD-10 カラムに通過させ、ウシ血清アルブミンを含む溶液部分を回収した。つまりPD-10 カラムのゲルに試料溶液が完全に吸収されたのち0.1 M 炭酸水素アンモニウム2.0 ml ずつをカラム上部にのせ、カラム下方から出る溶出液を2.0 ml ずつ分取した。目的タンパク質が2 ml から3.5 ml の間にそのほとんどが溶出するのを確認し、溶出2.0 ml から4.0 ml まで(Total 2.0 ml)を集め、各溶液の425 nmでの吸光度を再度測定した。このときそれぞれサンプル、コントロール、ブランク溶液の425 nmでの吸収を、サンプル E_s 、コントロール E_c 、ブランク E_b とし、次に示す式に従いニトロ化抑制率を計算した。

$$\text{ニトロ化抑制率} = [1 - \{E_c - (E_s - E_b)\} / E_c] \times 100$$

なお、生体関連物質の水溶液が可視部に吸収をもたず、PD-10 カラムを通過させる前のブランク溶液が425 nmにおいて吸収を持たない場合は、PD-10 カラムを通過させる前の各吸光度からニトロ化抑制率を計算した。

生体関連物質溶液の調製と反応混合液中での濃度

ペルオキシナイトライトのタンパク質に対する酸化・ニトロ化能を抑制する生体関連物質の検索は市販の試薬を用いた。Tryptophan, serotonin creatinine sulfate, pyrroloquinoline quinone, NAD, NADP, NADH, NADPH, riboflavin, L-ascorbic acid, glucose は蒸留水に、sinapinic acid, ferulic acid, epicatechin はジメチルスルフォキシドに10 mM濃度になるよう溶解し、それぞれ溶液Aでの最終濃度がtryptophanの場合は1.0 mM, それ以外は0.3 mMとなるように添加した。L-ascorbic acidを蒸留水に溶解する場合は、蒸留水および容器をあらかじめ窒素置換して嫌氣的に溶解した。Epigallocatechinは1 mMに、quercetinは

0.5 mMに蒸留水で溶解し、それぞれの最終濃度が0.3 mM, 0.2 mMになるよう調整した。

結果および考察

ペルオキシナイトライト添加量とウシ血清アルブミンの425 nmでの吸光度増加

ウシ血清アルブミン1 mg/ml溶液にペルオキシナイトライトを無添加および0.33 mM, 0.67 mM, 1.00 mM添加した時、溶液の色は濃度に依存して黄色味が増し、その各吸収スペクトルをFig-1 Aに示した。425 nmでの吸光度はFig-1 Bのようになった。この吸光度増加は、アルブミン中のチロシン残基がニトロ化され3-ニトロチロシン残基に変化しているものと推定される。このことから、少なくともペルオキシナイトライト処理最終濃度が1 mMまでは、ペルオキシナイトライトの添加量とウシ血清アルブミンの425 nmにおける吸光度の増加には、非常に良い比例関係が成立することが判明した。

生体関連物質によるペルオキシナイトライト消去能の測定

ペルオキシナイトライトの添加量に応じ、ウシ血清アルブミンの化学修飾による425 nmの吸光度増

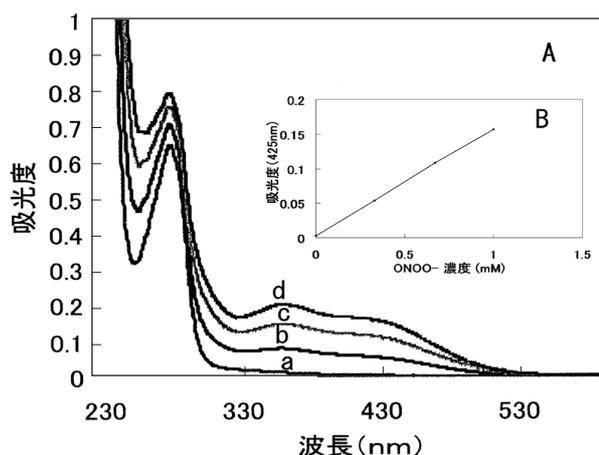


Fig-1 ペルオキシナイトライトとウシ血清アルブミンの反応

(A) ペルオキシナイトライト処理によるアルブミンの吸収スペクトル変化

ペルオキシナイトライト処理濃度 a: 0 mM, b: 0.33 mM, c: 0.67 mM, d: 1.00 mM

(B) ペルオキシナイトライト添加濃度と吸光度(425 nm)

表-1 生体関連物質のニトロ化抑制率

	抑制率 (%)
Sinapinic acid	24.9±0.8
Ferulic acid	42.5±0.8
Epicatechin	18.2±3.2
Epigallocatechin	75.4±2.1
Quercetin * ¹	20.4±0
NADP	-6.2±4.9
NADPH	47.0±2.1
NAD	6.8±5.1
NADH	42.6±2.6
Glutathione (reduced form)	56.1±0
Riboflavin	-3.0±0.2
Pyrroloquinoline quinine	0±0
Serotonin creatinine sulfate	67.6±1.6
Tryptophan * ²	51.9±0
L-Ascorbic acid	62.6±1.3
Glucose	0±0
DMSO (0.03 ml)	19.7±0

*1: 0.2 mM, *2: 1.0 mM

加が正比例の関係にあることから、同じ反応混液にあらかじめいくつかの生体関連物質を添加した場合のウシ血清アルブミンの化学修飾の抑制効果に関して検討した(表-1)。終濃度は tryptophan の場合は 1.0 mM, quercetin は 0.2 mM に、それ以外は 0.3 mM となるように添加した。

これらの結果から、polyphenol 類, flavonoid 類, 生体内還元物質, tryptophan 関連物質にその抑制効果が認められ、特に epigallocatechin における抑制効果が顕著であった。

Polyphenol 類や flavonoid 類の消去能に関しては既に多くの報告^{13)~16)}がされ、強力な scavenger として p-coumaric acid, ferulic acid, sinapinic acid, caffeic acid, pelargonidin, catechin, epicatechin, quercetin が挙げられているが、今回の ferulic acid, sinapinic acid での結果は、評価法の違いも関係しているのか、それらより小さく評価された。また、アミノ酸に関しては tyrosine,

tryptophan にその消去能が認められている²⁰⁾。なお, sinapinic acid, ferulic acid, epicatechin を溶解するのに用いたジメチルスルフォキシドのみを添加した場合でも、反応混液に 0.03 ml (3%) 存在したときに約 20% 弱の抑制効果を示したことから、sinapinic acid, ferulic acid, epicatechin の抑制効果は、さらに小さく評価されるべきかもしれない。一方、ジメチルスルフォキシド単独によるニトロ化抑制能に関しては加藤ら¹⁹⁾が 10% 濃度ではほとんどその効果が見られないのに対し、1% 濃度では約 10% 近くの抑制効果があることを報告しており、この溶媒を使用した実験での評価はさらに詳細な検討が必要である。また, sinapinic acid, ferulic acid, epicatechin を用いた時は、ペルオキシナイトライト処理したウシ血清アルブミンとこれら低分子あるいはその誘導体が PD-10 カラムを用いた分子篩効果や ODS カラムを用いた HPLC で分離されなかった(未発表データ)ことから、これら低分子物質がタンパク質と結合し、両者の間に何らかの相互作用が生じ、425 nm の吸光度に影響している可能性も考えられる。

今回は *in vitro* の実験ではあるが、生体内に存在する還元型補酵素や serotonin creatinine sulfate, tryptophan がペルオキシナイトライトの消去に関与している可能性を示唆した。また、食物として摂取する catechin 類等も消去に有効である可能性が認められた。

なお、ペルオキシナイトライト消去能に関する評価法の妥当性に関しては、ペルオキシナイトライトによる酵素の活性阻害の抑制効果や ELISA 法による分析など、異なったいくつかの評価法で現在検討中である。

要 約

生体物質によるペルオキシナイトライト消去能を、ウシ血清アルブミンのニトロ化抑制率で評価した。Polyphenol 類や還元型補酵素にその効果が顕著に認められた他, tryptophan や serotonin creatinine sulfate にも強力な抑制効果が確認された。

引用文献

- (1) Hausladen, A. and Fridovich, I. (1994) Super-oxide and peroxy-nitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* **269**, 29405–29408
- (2) Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxy-nitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 29409–29415
- (3) Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., and Murayama, K. (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxy-nitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* **273**, 14085–14089
- (4) Fujigaki, H., Saito, K., Lin, F., Fujigaki, S., Takahashi, K., Martin, B. M., Chen, C. Y., Masuda, J., Kowalak, J., Takikawa, O., Seishima, M., and Markey, S. P. (2006) Nitration and inactivation of IDO by peroxy-nitrite. *J. Immunol.* **176**, 372–379
- (5) Ji, Y., Neverova, I., Van Eyk, J. E., and Bennett, B. M. (2006) Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione S-transferase by peroxy-nitrite. *J. Biol. Chem.* **281**, 1986–1991
- (6) Klotz, L. O., Schroeder, P., and Sies, H. (2002) Peroxy-nitrite signaling: receptor tyrosine kinase and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 737–743
- (7) Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C. (2003) Peroxy-nitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* **140–141**, 113–124
- (8) Kanski, J., Alterman, M. A., and Schöneich, C. (2003) Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1229–1239
- (9) Kanski, J., Behring, A., Pelling, J., and Schöneich, C. (2005) Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **288**, H 371–H 381
- (10) Kanski, J., Hong, S. J., and Schöneich, C. (2005) Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification of nitrotyrosine-containing sequences *in vivo* by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **280**, 24261–24266
- (11) Ischiropoulos, H. (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1–11
- (12) Shin, S-G., Kim, J. Y., Chung, H. Y., and Jeong, J. C. (2005) Zingerone as an antioxidant against peroxy-nitrite. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7617–7622
- (13) Pannala, A. S., Singh S., and Rice-Evans, C. (1999) Flavonoids as peroxy-nitrite scavengers *in vitro*. *Methods Enzymol.* **299**, 207–235
- (14) Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., and Osawa, T. (1999) Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxy-nitrite-mediated tyrosine nitration of protein *in vitro*. *FEBS Lett.* **459**, 43–46
- (15) Tsuda, T., Kato, Y., and Osawa, T. (2000) Mechanism for the peroxy-nitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett.* **484**, 207–210
- (16) Ferroni, F., Maccaglia, A., Pietraforte, D., Turco, L., and Minetti, M. (2004) Phenolic antioxidants and the protection of low density lipoprotein from peroxy-nitrite-mediated oxidations at physiologic CO₂. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2866–2874
- (17) Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1994) Peroxy-nitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 149–156
- (18) Bailly, F., Zoete, V., Vamecq, J., Catteau, J. -P., and Bernier, J. -L. (2000) Antioxidant actions of othiol-derived 4-mercaptoimidazoles: glutathione peroxidase activity and protection against peroxy-nitrite-induced damage. *FEBS Lett.* **486**, 19–22
- (19) Kato, Y., Ogino, Y., Aoki, T., Uchida, K., Kawakishi, S., and Osawa, T. (1997) Phenolic antioxidants prevent peroxy-nitrite-derived collagen modification *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3004–3009
- (20) Frears, E. R., Zhang, Z., Blake, D. R., O'Connell, J. P., and Winyard, P. G. (1996) Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxy-nitrite. *FEBS Lett.* **381**, 21–24

(まつもと たかし 生活機構研究科)
(わかばやし ゆう 平成 16 年度生活科学科卒業生)
(いけだ けいいち 順天堂大学スポーツ健康科学部健康学科)
(やまくら ふみゆき 順天堂大学医療看護学部)