

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32623

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11676

研究課題名(和文)食品中のニトロ化トリプトファン生成が生体へ及ぼす影響の解析

研究課題名(英文)Analysis of the biological effects of nitrated tryptophan formation in food

研究代表者

川崎 広明(Kawasaki, Hiroaki)

昭和女子大学・食健康科学部・講師

研究者番号：40531380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで疾患の酸化ストレス下でタンパク質中に生成され、タンパク質機能の傷害を引き起こすことで疾患病態の形成に関与すると考えられてきたトリプトファンのニトロ化修飾物・6-ニトロトリプトファンが、獣肉や魚肉などの食品のタンパク質中にも存在していることを本研究で明らかにした。トリプトファンは必須アミノ酸であり、セロトニンなど生理活性物質の材料としても重要であることから、食品中の6-ニトロトリプトファンがこれらの代謝に影響を及ぼすことでヒトの健康に影響する可能性があるのではないかとということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品に含まれる化学物質は、体内に取り込まれて様々な影響を身体に及ぼす可能性がある。従い、本研究で食品中に存在する新たな化学修飾アミノ酸として6-ニトロトリプトファンを見出されたことにより、医学分野や生物学分野の研究者に対して、当該物質に着目することの重要性を提起することとなった。今後、当該物質の生体への影響を広く調べることで、ヒトの健康増進や疾患の治療などの分野の発展にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that the 6-nitrotryptophan, which was generated under the oxidative stress and caused some disease conditions by protein disfunction, was also generated in some food such as pork, beef and fish meat. These facts suggested that the 6-nitrotryptophan from food might be affected human health by confusing the tryptophan metabolisms such as serotonin generation.

研究分野：生化学

キーワード：6-ニトロトリプトファン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

《 背景 1. トリプトファンのニトロ化修飾 》

酸化ストレス下では、強力な酸化・ニトロ化剤であるペルオキシ亜硝酸などの活性窒素種が生じ、タンパク質や核酸などの生体内物質を酸化・ニトロ化修飾する。芳香族アミノ酸であるトリプトファンは、このような環境下で6-ニトロトリプトファンとなる。この6-ニトロトリプトファンは酸化ストレスを捉えるマーカーとしての役割以外にも、後述のようにタンパク質機能に影響を及ぼすことで疾患の成り立ちに関与すると考えられる。我々は、この6-ニトロトリプトファンを効率的に検出できる特異抗体を独自に開発することに成功し(川崎ら、特許第6143550号)各種疾患の病態形成機構の解明に役立てている。

《 背景 2. トリプトファンのニトロ化修飾はタンパク質の機能を傷害する 》

トリプトファンのニトロ化修飾がタンパク質中に生じると、そのタンパク質の機能が抑制、あるいは亢進されることが報告されている。我々も、生体内 pH の調整に重要な酵素の1種である carbonic anhydrase III 中のトリプトファンがニトロ化修飾されると機能傷害を受け酵素活性が低下することを報告している(Kawasaki et al., Free Radic. Biol. Med. 73:75-83, 2014.)。また、遊離のトリプトファンのニトロ化物は、トリプトファン代謝に重要なキヌレニン経路の律速酵素である Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の活性を阻害することも報告されている(Southan et al., Medical Chemistry Reserch. 6:343-352, 1996)。

《 背景 3. 食品中での芳香族アミノ酸のニトロ化 》

食品添加物として知られる亜硝酸塩は、ニトロソ化合物を生成して発ガン性に関与することが指摘されているが、芳香族アミノ酸のニトロ化に関与する可能性がある。Heroldらは、食肉の酸化によって生じると考えられるメトミオグロビン・カタラーゼ等の作用で生じる過酸化水素・食品添加物などから生じる亜硝酸の3物質の存在下で、トリプトファンのニトロ化が生じうることを *in vitro* の実験系で明かにしている(Herold, Free Radic. Biol. Med., 36: 565-579, 2004.)。しかしながら、実際の食品中からのニトロ化トリプトファンの検出は、これまでにされていない。

《 背景 4. 腸管機能とトリプトファン由来の生理活性物質 》

食事中のトリプトファンは、タンパク質を構成するアミノ酸としての利用に加え、セロトニンやナイアシンなど生理活性物質の原材料として重要である。また、腸管においては、免疫系の細胞や腸内細菌が遊離のトリプトファンを利用することで、セロトニンやドーパミンなどの生理活性物質の産生に関与しており、ヒトの免疫系や神経系の調節に重要であることが分かっている(藤田、心身健康科学8巻2号,69-73,2012.)。背景3にも記述したが、*In vitro* の実験では、6-ニトロトリプトファンが生理活性物質の生成に重要な酵素に影響を及ぼす可能性があることが示されているが、ヒトや実験動物などの *in vivo* での影響に関する報告はない

2. 研究の目的

上述の背景.1~背景.4 から、活性酸素と一酸化窒素、亜硝酸などは、芳香族アミノ酸であるトリプトファンのニトロ化を引き起こし6-ニトロトリプトファンを生成することや、6-ニトロトリプトファンがタンパク質の機能を傷害して、疾患の病態形成につながる可能性があることが示されている。また、遊離の6-ニトロトリプトファンがトリプトファン代謝系の酵素阻害剤として働き、免疫系や神経系の異常につながる可能性があるとの報告も示されている。しかしながら、トリプトファンが必須アミノ酸であり食品からの供給が重要な物質であるにもかかわらず、この6-ニトロトリプトファンの食品からの供給とその影響に関する研究はなく、6-ニトロトリプトファンの食品中の存在と生体に及ぼす影響については、全く明らかされていない。そこで本研究では、食品中の6-ニトロトリプトファンに着目し、(1)食品中に6-ニトロトリプトファンが存在するのか、(2)食品中の6-ニトロトリプトファンは生体の機能に影響を及ぼすのかの2点を明らかにすることを目的とした。

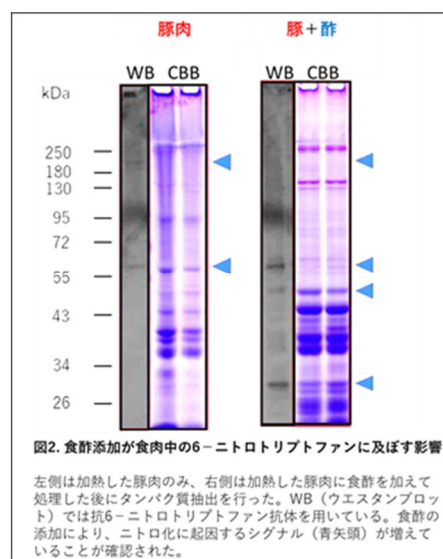
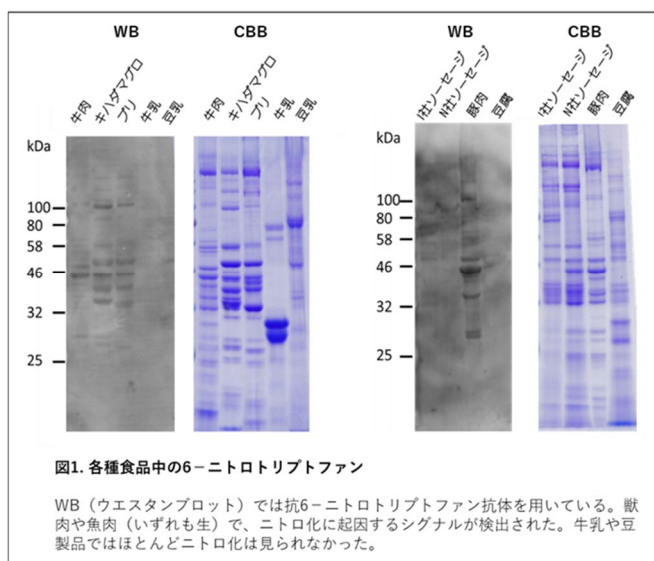
3. 研究の方法

獣肉・魚肉・豆加工品・牛乳などの各種食品および調理過程を模した処理を施した食品(各種食品への加熱や食酢の添加など)からタンパク質抽出を行い、SDS-PAGEによるタンパク質の分離を行った。分離後のタンパク質に対して、抗6-ニトロトリプトファン・マウスモノクローナ

ル抗体を用いたウエスタンブロットを行い、6-ニトロトリプトファンの存在の有無を確認した。さらに、LC-MS/MS解析も併用して、6-ニトロトリプトファンを含むタンパク質の同定と被修飾残基部位の特定も行った。また、生体中での影響の解析などで必須となる遊離ニトロ化トリプトファンの定量化に向けた実験法の構築も行った。

4. 研究成果

目的の(1)について、各種食品中に6-ニトロトリプトファンが含まれることを初めて明らかにすることができた。特に豚肉をはじめとする獣肉や魚肉などに、ウエスタンブロットによって多くの6-ニトロトリプトファンの存在を確認した(図1)。また、LC-MS/MS解析によってもこれらの食品中から複数の被修飾タンパク質を検出することができた。従い、これらの食品が生体への6-ニトロトリプトファンの供給源となりうることが示唆された。さらに加熱や食酢添加といった調理過程は、食品に含まれるトリプトファンのニトロ化修飾の量に影響を及ぼす可能性があることが示された(図2)。特に食酢添加時の影響が顕著であったことから、調理過程での酸添加だけでなく、胃酸による消化過程での酸性条件によっても6-ニトロトリプトファンの生成が増加することも考えられる。さらに、本研究の実施過程で多くの研究者と交流を持つ中で、宇宙環境を模した放射線曝露下において、獣肉中の6-ニトロトリプトファンが増加するという知見も得ることができている(M. Hatsuda, H. Kawasaki, et al., Journal of Neutron Research 25 (2023) 41-46.)。従い、食品中には多くの6-ニトロトリプトファンが存在しているということが明らかになった。



このように、食事からの6-ニトロトリプトファンの供給がなされる可能性が極めて高くなったことから、次のステップである目的の(2)の達成のために実施する「6-ニトロトリプトファンの生体内への取り込みと生体への影響の解析」で必要となる手法である生体内の遊離の6-ニトロトリプトファンの検出・定量系の構築を試みた。しかしながら、抗体を用いたELISA法やイムノクロマト法、ニトロ化物吸着の可能性のある炭素素材を用いた方法など様々な原理を駆使して構築を試みたが、いずれも十分な定量性を持った方法の構築には至らなかった。現在、引き続きこれらの方法の構築に向けた実験を試みている。

本研究で得られた知見は、食品中から供給される可能性のある化学修飾アミノ酸として6-ニトロトリプトファンを新たに見出したものであり、先述の当該物質の検出・定量系が構築できたならば、生体に当該物質が及ぼす影響の解明に大きく寄与することとなり、ヒトの疾患の機序や生理機能の解明に新たな視点からのアプローチを供与するものとなる。本研究で得られた知見を基盤とし、さらに研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 川崎広明、重永綾子、青木優奈、池田啓一、飯泉恭一、馬場猛、松本孝、山倉文幸
2. 発表標題 調理過程が食肉中のニトロ化トリプトファンに及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会第40回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山 理紗, 川崎 広明, 重永 綾子, 飯泉 恭一, 池田 啓一, 馬場 猛, 松本 孝, 山倉 文幸
2. 発表標題 Detection of tryptophan nitration in food product as a step towards elucidating physiological effects of tryptophan nitration
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎広明、重永綾子、飯泉恭一、馬場猛、池田啓一、松本孝、山倉文幸
2. 発表標題 食品中のニトロ化トリプトファンの検出～遊離6-ニトロトリプトファンの生理的影響の解明に向けて～
3. 学会等名 第39回日本トリプトファン研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 初田真知子、川崎広明、重永綾子、山倉文幸、竹谷篤、高梨宇宙、若林康生、大竹淑恵、鎌田弥生、黒河千恵、池田啓一、家崎貴文、長岡功
2. 発表標題 食肉への宇宙放射線の影響
3. 学会等名 第40回日本トリプトファン研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machiko Hatsuda, Hiroaki Kawasaki, Fumiyuki Yamakura, Atsushi Taketani, Takaoki Takanashi, Yasuo Wakabayashi, Yoshie Otake, Yayoi Kamata, Chie Kurokawa, Keiichi Ikeda, Ayako Shigenaga, Takafumi Iesaki, Isao Nagaoka.
2. 発表標題 Effects of neutron radiation as cosmic radiation on food resources.
3. 学会等名 UCANS9 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machiko Hatsuda, Hiroaki Kawasaki, Atsushi Taketani, Ayako Shigenaga, Takaoki Takanashi, Yasuo Wakabayashi, Yoshie Otake, Yayoi Kamata, Keiichi Ikeda, Fumiyuki Yamakura.
2. 発表標題 The modification of meats with a cosmic neutron radiation.
3. 学会等名 Neutrons and Food 6 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 初田真知子、山倉文幸、川崎広明、大竹淑恵、竹谷 篤、高梨宇宙、若林泰生、奥内菜緒、小金井優美、籠谷汐美、木村颯斗、濱野由衣、吉田真理亜
2. 発表標題 深宇宙環境におけるドライ食肉への中性子線の影響
3. 学会等名 日本物理学会2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machiko Hatsuda, Atsushi Taketani, Takaoki Takanashi, Yasuo Wakabayashi, Yoshie Otake, Hiroaki Kawasaki, Ayako Shigenaga, Akari Ichinose, Yayoi Kamata, Hayato Kimura, Yumi Koganei, Shiomi Komoriya, Miu Sakai, Yui Hamano, Maria Yoshida, Keiichi Ikeda, Fumiyuki Yamakura
2. 発表標題 Effects of neutron radiation on food in deep space environments.
3. 学会等名 AMACEE2022/ATSA2022/LEA2022 Joint International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山倉 文幸 (Yamakura Fumiyuki)		
研究協力者	重永 綾子 (Shigenaga Ayako)		
研究協力者	飯泉 恭一 (Iizumi Kyoichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------