

3-ニトロチロシン

萩野景規

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 公衆衛生学

キーワード：3-ニトロチロシン，活性窒素種，翻訳後修飾

要約

種々の機序により産生された活性窒素種 (reactive nitrogen species) によるチロシン残基のニトロ化による3-ニトロチロシン (3-NT) の生成は、蛋白質の翻訳後修飾の一つとして広く認められている。種々の炎症性疾患組織では、一酸化窒素・二酸化窒素・ペルオキシナイトライトといった活性窒素種が異なる機序で産生され、3-NTの産生に関与している。チロシンニトロ化蛋白質の同定や、蛋白質分子中のチロシンニトロ化部位が決定できるようになり、蛋白質の寿命、蛋白質間相互作用に対する悪影響、蛋白質機能喪失との関連づけが可能になってきた。測定法としては、免疫組織化学的手法、ウェスタンブロッティングによる半定量法から、ELISA, HPLC-ECD, LC-MS/MS, GC-MS/MSを用いた定量的な方法がある。本総説では、3-NTについて、その生成機序、測定方法、予防医学的応用を述べる。

一酸化窒素 (NO) の生成

蛋白質内チロシン残基のニトロ化を論じる場合、最

初に示さねばならないのが、一酸化窒素 (NO) である。既に広く知られているように、心血管系のシグナル分子としてのNOの発見は、1998年、Robert Furchgott, Louis Ignarro, Ferid Muradらにノーベル賞をもたらした。ノーベル賞は、ダイナマイトの原料であるニトログリセリンで一財を成した Alfred Nobelにより設立された Nobel 財団により授与される。Alfred Nobelは、自身の狭心症の治療にニトログリセリンを使用していたらしい。ニトロ化合物であるニトログリセリンの心血管系での作用機序は、一部解明され、mitochondrial aldehyde dehydrogenaseが代謝に関与しているらしい¹⁾。

NOは基本的に3種類のNO合成酵素 (NOS) によりL-アルギニンを基質とし、L-シトルリンへ変換するとき生成され、神経由来のNOS-1 (nNOS 又は type I NOS), 誘導型のNOS-2 (iNOS 又は type II NOS), 内皮細胞由来のNOS-3 (eNOS 又は type III NOS) が知られている²⁻⁴⁾。NOS-1やNOS-3は、細胞に恒常的に発現しており、細胞内カルシウムの上昇に伴うカルモジュリンの結合により活性化されるのに対して、NOS-2はカルモジュリンが常に結合しておりカルシウムの上昇に関係なく、内毒素 (endotoxin) や前炎症性サイトカイン等の種々の刺激により誘導される。つまり、NOS-2は、定常状態の細胞には発現せず、刺激が加わると種々の細胞に発現し、他のNOS

平成18年11月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7184 FAX：086-226-0715
E-mail：kogino@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



昭和55年4月に、山口大学医学部医学科を卒業後、昭和55年6月、山口大学医学部附属病院第一内科へ入局。その後、昭和63年8月に、山口大学医学部助手、講師、助教授 (公衆衛生学講座) を経て、平成7年2月には、金沢大学医学部教授 (公衆衛生学講座) に就任する。この度、平成18年4月、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授 (公衆衛生学分野) に就任し現在に至る。最近の研究テーマは、活性窒素種の生体影響によるバイオマーカーとしてのチロシンニトロ化蛋白質の検索である。今後、生活習慣病予備軍を対象にチロシンニトロ化蛋白質の質的、量的検討により、予防医学的リスク評価を行う予定である。

に比し多量の NO を産生する。すなわち、多量に産生された NO が疾病に関与することになる。

ニトロ化とニトロソ化

アミノ酸の中でベンゼン環を有するチロシンとフェニルアラニン、そして（ベンゼン環を一部含む）イミダゾール環を有するトリプトファンは、反応性の高い活性窒素種の一つであるペルオキシナイトライト (ONOO^-) が作用すると NO_2^- 基を付加され、それぞれ、ニトロチロシン、ニトロフェニルアラニン、ニトロトリプトファンを生成することが知られている⁵⁾ (図 1)。一方、NO は、蛋白質中アミノ酸であるシステインやシスチンを含むトリペプチドであるグルタチオンと SH 基を介して直接結合し、ニトロソチオール (S-Nitrosothiols ; SNOs) を生成し、NO のプールされた状態として存在する。ニトロソチオールは、細胞増殖に関与するオルニチン脱炭酸酵素 (ornithine decarboxylase) の活性中心のシステインに結合し活性を抑制することや⁶⁾、カスパーゼ (caspase-3) のシステイン残基に結合しニトロソ化/脱ニトロソ化の調節からアポトーシスに関与することが知られている⁷⁾。しかしながら、ニトロソ化の詳細な生体調節作用に関しては、ここでは紙面の都合上割愛させていただき、JS Stamler らの総説を参考にされたい^{8,9)}。

チロシンニトロ化に関与する活性窒素種の産生機序 (図 2)

チロシンのニトロ化は、ペルオキシナイトライト (ONOO^-)¹⁰⁾、二酸化窒素 (NO_2)^{11,12)}、塩化ニトリル (NO_2Cl)¹³⁾ のチロシン残基芳香環への攻撃で、蛋白質のチロシン残基、及び血中及び組織中に存在するチロシンに対してニトロ基による共有結合修飾がなされることで起こる。 ONOO^- は通常、スーパーオキシド (O_2^-)

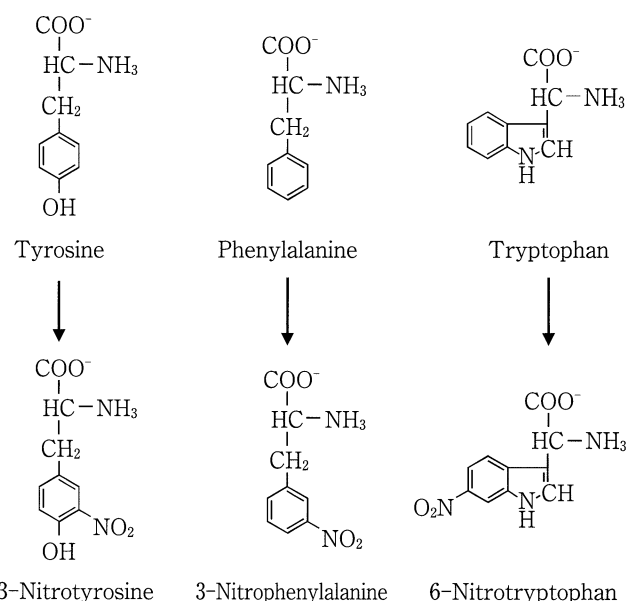


図 1 チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンとそのニトロ化物

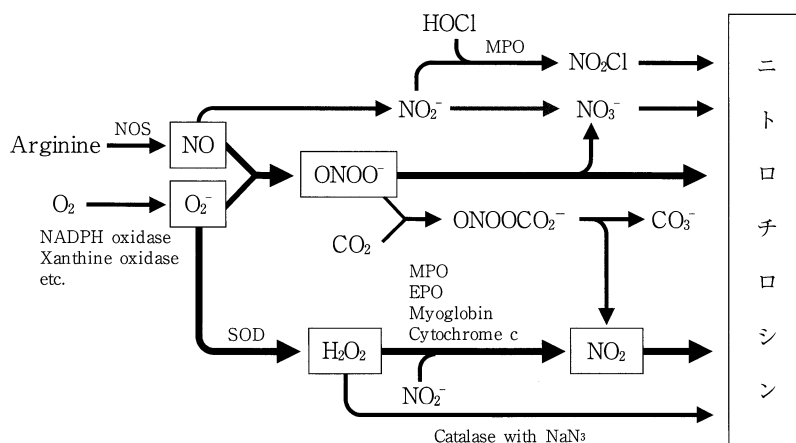


図 2 生体におけるニトロチロシンの生成機序

ペルオキシナイトライトを介した経路、ペルオキシダーゼの関与する過酸化水素を介した経路がよく知られているが、その他にも塩化ニトリル、硝酸イオン（酸性条件）、ニトロソペルオキシカルボキシレート、カタラーゼを介した機構も存在する。図中の略語：NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form ; EPO, eosinophil peroxidase, MPO, myeloperoxidase ; NOS, nitric oxide synthase.

と、一酸化窒素合成酵素 (NOS) により生成された NO との反応により生成する¹⁴⁾。NO と O_2^- の反応速度が O_2^- の不均化 (代謝) 酵素である銅・亜鉛-スーパーオキシドディスムターゼ (Cu, Zn-superoxide dismutase; Cu, Zn-SOD) と O_2^- の反応速度に近いために NO が O_2^- を奪うことによるとされている。 O_2^- は、キサンチン酸化酵素やミトコンドリア電子伝達系をなす NAD(P)H オキシダーゼ等により生成される¹⁴⁻¹⁶⁾。また NO_2^- は、ミエロペルオキシダーゼ (MPO), 好酸球ペルオキシダーゼ (EPO), ミオグロビン, シトクロム c といったヘム含有蛋白質によって、過酸化水素 (H_2O_2) の存在下で亜硝酸イオン (NO_2^-) の酸化により生成される^{12, 17-22)}。同じくヘム蛋白質の一つであるカタラーゼは、その阻害剤であるアジ化ナトリウムおよびカタラーゼ-過酸化水素複合体との反応によりチロシンをニトロ化する²³⁾。Mn-SOD, プロスタサイクリンといった金属含有蛋白質は、ONOO⁻による自己ニトロ化を触媒する^{24, 25)}。非酵素的なチロシンニトロ化は、二酸化炭素 (CO_2) と ONOO⁻ の反応中間体として生成するニトロソペルオキシカルボキシレート (ONOO CO_2^-) を介して最終的に CO_3^{2-} と NO_2^- の作用によって生じるとされている。さらに、 NO_2^- から生じた硝酸イオン (NO_3^-) による、酸性条件での反応も指摘されている²⁶⁻²⁸⁾。 NO_2Cl は、MPO により産生された次亜塩素酸 (HOCl) による亜硝酸イオンの酸化により生成し、チロシンをニトロ化する²⁹⁾。

チロシンのニトロ化機序

多くの蛋白質のチロシンニトロ化が知られている。生理的状态においても活性酸素種や活性窒素種の産生がなされ、多くの生理的酸化還元調節を行っている。それ故、3-NT の産生も病的状態のみならず、生理的状态でも検出されている。しかしながら、全ての蛋白質がニトロ化されるわけではないし、さらに蛋白質内の全てのチロシンがニトロ化されるわけではない。そこには、ある程度の法則が考えられている。すなわち 1) 活性窒素種の発生場所、2) 活性窒素種の種類とその化学的特性、3) 蛋白質の構造と局所環境等である。

1) 活性窒素種の発生場所

ONOO⁻ の生成は、NO の発生源 NOS が細胞質に存在することから、さらに O_2^- は細胞膜を通過しないことより、主な ONOO⁻ の標的蛋白質は細胞質又は細胞

膜内に存在すると考えられる。しかしながら、NO の膜透過性から細胞外で産生される O_2^- との反応によることもあり、細胞外マトリックス蛋白質も標的となり特異性はない。ペルオキシダーゼ依存性の 3-NT 産生は、特に MPO について調べられており、MPO は血管内皮細胞によって内皮細胞内に取り込まれ、 H_2O_2 , NO_2^- 存在下でフィブロネクチン (fibronectin) をニトロ化する³⁰⁾。動脈硬化症患者の血清中の apolipoprotein A1 (apo A1) のチロシン残基のニトロ化には、apo A1 と MPO の結合による機序が指摘されている³¹⁾。このように MPO の存在する場所は、チロシンニトロ化に関与する活性分子種が発生する可能性がある。

2) 活性窒素種の種類とその化学的特性

ONOO⁻ は、MPO/ H_2O_2 / NO_2^- 系反応に比し細胞膜内の疎水性部分でペプチド内チロシン残基のニトロ化を起こしやすいことが知られている³²⁾。すなわち、ONOO⁻ は、ONOOH として作用し、細胞膜透過性が増し、約 30% が NO_2^- と OH^- に分解される。 OH^- はチロシンをチロシンラジカルに変換し、そこへ NO_2^- (ラジカル) が反応してニトロ化が成立する。それに比し、MPO/ H_2O_2 / NO_2^- 系反応では、MPO/ H_2O_2 結合体がチロシンをチロシンラジカルに変換し、また NO_2^- を NO_2 に酸化する。最終的に NO_2 がチロシンラジカル反応することによりニトロ化が成立する。 NO_2 (ラジカル) によるチロシンのチロシンラジカルへの変換は、反応が遅い。

3) 蛋白質の構造と局所環境

チロシンは、芳香族アミノ酸の中では疎水性が低いいため蛋白質内部に埋没していることは少なく、表面に露出していることが多い³³⁾。しかしながら、ニトロ化されるチロシンは、必ずしも表面に露出したチロシン残基ではない。グルタミン合成酵素では、露出しているチロシン残基がニトロ化されるのに対して³⁴⁾、チロシン水酸化酵素では、423番目のチロシンがニトロ化される³⁵⁾、Mn-SOD では、34番目のチロシンがニトロ化される³⁶⁾。どちらも蛋白質表面ではなく、Mn-SOD では酵素活性中心に近い。

ニトロ化を受けやすいチロシン残基の環境として、リン酸化修飾部位に近いことが指摘されている。すなわち、2次、3次構造から、ターン構造などの立体障害構造が近くにないことや、チロシンの近傍に陰性のアミノ酸、例えばグルタミン酸が存在することが重要らしい³³⁾。チロシンニトロ化が、蛋白質の立体構造と

機能に与える影響に関しては、明確な見解はないが、pKa がチロシンの水酸基による10.07から3-NTの7.5に変わることによる蛋白質分子の局所的荷電の変化が大きく影響していることは想像される³⁷⁾。

チロシンニトロ化蛋白質とニトロ化の影響

図3に示されている蛋白質は、既にチロシンのニトロ化が証明されているものである。蛋白質のチロシンニトロ化修飾が蛋白質機能を低下させる場合と、逆に亢進させる場合がある。移植後、拒絶された腎臓から3-NT含有蛋白質として、細胞内ミトコンドリアに存在するO₂⁻の消去酵素であるMn-SODが検出された²⁴⁾。アミノ酸配列の34番目のチロシンのニトロ化と酵素活性の低下が報告されている³⁶⁾。HDLコレステロールのアポ蛋白質であるapo A1の192番目のチロシンのニトロ化がMPOの結合によって引き起こされ、apo A1のコレステロール放出機能低下が指摘されている³⁸⁾。Mn-SODとapo A1は、ヒト生体試料からの報告であり、特にMn-SODのチロシンニトロ化は、他のプロテオーム解析でも確認されており、ミトコンドリアにおける活性窒素種の産生を意味している。変異型SOD1(Cu, Zn-SOD)遺伝子を導入した家族性筋萎縮性側索硬化症の疾患モデルマウスでは、脊髄から32種類のチロシンニトロ化蛋白質を同定し、その内、解糖系の酵素である α -エノラーゼの43番目のチロシンのニトロ化が指摘され、糖代謝が障害されていることが推測された³⁹⁾。この研究の特徴は、 α -エノラーゼのリン酸化部位であるチロシンがニトロ化を受けるこ

Mn-SOD : Y34
Apolipoprotein A-1 : Y192, Y166
Prostacyclin synthase : Y430
α -Enolase : Y43
c-Src tyrosine kinase
Actin : Y91, Y198, Y240
α -Synuclein : Y39, Y125, Y133, Y136
Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2a) : Y294, Y295
Creatine kinase : Y14, Y20

図3 ニトロ化と機能変化が証明されている蛋白質各蛋白質について、ニトロ化されやすいチロシン残基を示した。図中の略語；Mn-SOD, manganese superoxide dismutase.

と、正常マウスの脊髄に認められる多くのニトロ化蛋白質の量が神経変性疾患群で増加していることである。ウシでは、粥状硬化動脈の病変部試料から、3-NT含有プロスタサイクリン合成酵素が証明された。プロスタサイクリン合成酵素は、ヘム蛋白質でありヘム近傍の430番目のチロシンがニトロ化され、動脈硬化初期段階からニトロ化による酵素活性低下がプロスタグランدينH₂の蓄積を招き、血小板の凝集、血栓形成に至る過程を推測させる^{25,40)}。ヒト膵管腺癌では、c-srcチロシンキナーゼのチロシンニトロ化によりチロシンキナーゼ活性、チロシンリン酸化の上昇を認めている⁴¹⁾。鎌状赤血球症では、細胞骨格蛋白質であるアクチンに、パーキンソン病では、発症に関与しているとされる蛋白質の1つであるシヌクレイン(synuclein)にそれぞれモデルマウス試料からの分析で3-NTが証明されているが、機能との関係は不明である^{42,43)}。また、老化と共に増加するニトロ化蛋白質も心臓、骨格筋で証明されている^{44,45)}。

プロテオーム解析により、炎症、筋萎縮性側索硬化症、喘息、老化等の病態において、多くのチロシンニトロ化蛋白質が報告されているが、機能との関連は不明なものが多い。

チロシンニトロ化蛋白質の処理

チロシンニトロ化蛋白質は、細胞内蛋白質分解システムで処理されることが指摘されている^{46,47)}。また、生体内チロシンニトロ化蛋白質の処理酵素の検索が、ウェスタンブロットを用い検討されている。ニトロ化したヒストン1.2の3-NT抗体との反応蛋白質バンドが、LPS刺激RAW 264.7破碎細胞添加により消失することや、ニトロ化ヒストンIIIの抗体との反応バンドが還元型グルタチオンにグルタチオンS-トランスフェラーゼ又はグルタチオンペルオキシダーゼを添加することにより消失することを認めているが、「脱ニトロ酵素」と呼ばれる酵素の存在は、証明されていない⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

しかしながら、遊離型の3-NTやニトロ化DNAのニトロ基がリポイル脱水素酵素によりアミノ基に還元されることは既に報告されている⁵¹⁾。

3-ニトロチロシンの定量

免疫学的手法による検出

チロシンニトロ化修飾を受けた蛋白質の免疫学的定

量は、ELISA法（enzyme-linked immunosorbent assay）により行われてきた。モノクローナル抗体を用いた場合、ELISA法のLOD（limit of detection）は、10～20 nmol/Lである⁵²⁻⁵⁵。さらに、ELISAで放射性同位元素を用いた場合、LODは0.2 nmol/Lに改善される⁵⁶。液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー装置の入手・維持管理が煩雑・高価であることもあり、多サンプルを一度に処理できるELISA法は広く使用されている。ELISA法の欠点としては、遊離型3-NTの検出ができないこと、蛋白質表面の3-NTしか検出できないことが挙げられる。実際は、蛋白質内部にも多くのニトロ化されたチロシン残基が存在する。また濃度の決定には正確性、および低い検出限界と定量限界の実現が求められるので、ELISAは蛋白質内チロシンニトロ化の半定量的検出法としては有用であろう。

ガスクロマトグラフィーによる検出

NCI GC-MS/MS（negative chemical ionization gas chromatography-tandem mass spectrometry）が、LC-MS/MSよりも高感度であること、かつアーティファクトの生成が無視できるという点で望ましいとされ、LODおよびLOQ（limit of quantification）はそれぞれ3～4 pMおよび30～125 pMで、健常者の遊離型3-NT濃度は0.5～2.9 nMであると推測される。12人の健常者から得られた血漿における、蛋白質結合型3-NTは、0.6 pmol/mg proteinとの報告がある⁵⁷⁻⁶⁰。

ヒトの尿からも、NCI GC-MS/MSによる3-NTの検出が可能である⁵⁸。健常者の尿における3-NT濃度は 8.4 ± 10.4 nM（mean \pm SD、測定値：1.6～33.2 nM）であった。

この方法の欠点としては、揮発性を改善するため誘導体化が必要となり、その処理過程に酸性条件があり、人工的チロシンニトロ化が起こりうる。これを抑制する方法もいくつか考案されている^{57,59}。

液体クロマトグラフィーによる検出

3-NTは、350～450 nmに吸収ピークを持つことから、UVもしくは蛍光検出器を用いたHPLC測定法が可能である^{61,62}。しかし、HPLC-UV、HPLC-FL双方とも、ほとんどの生体サンプルの低濃度3-NT検体の測定が難しいことが示されている。

HPLCとECDとの組み合わせたHPLC-ECDは高い感度と選択性を有し、そのLODは0.2～50 nMであった^{63,64}。生体サンプル中の3-NTは10 μ lの投入あた

り1 pmol（5 nM）以下で検出可能である⁶⁵。我々は、pH2.5という強酸性の移動相を用いる過去に前例のない方法を構築し、LPS投与群・非投与群における血清中の蛋白質結合型3-NT濃度を、それぞれ 0.593 ± 0.053 および 0.114 ± 0.027 pmol/mg proteinと推定した。我々の実験手法は、面倒なサンプル前処理を必要としないことから、多数の臨床サンプルを分析するのに適していると考える〔未発表〕。

LC-MSは、ここ数年で急速に発展した方法である。LC-MS/MS法におけるLODはそれぞれ0.442 nM以下であり、HPLC-ECDに比して100倍以上の高感度であると結論づけられている。一方で、LC-ESI（electrospray ionization）-MS/MS法に基づいた新規の高感度、特異的な測定法が報告されており、LODおよびLOQはそれぞれ0.43 nMおよび1.4 nMであった⁶⁶。

HPLC-ECD、GC-MS（/MS）、LC-MS（/MS）の共通の問題点

蛋白質結合型3-NTの測定には、蛋白をアミノ酸レベルにまで分解する必要があるが、通常HClによる酸性条件での加水分解が用いられてきた。しかし酸性条件下では、硝酸イオン、亜硝酸イオンの混入により人工的なチロシンのニトロ化が起こる⁶⁵。スカベンジャーであるフェノールの添加により、アーティファクト生成は抑制されるが、完全な消失には至らない⁶⁷。別の手法として、気相でのHCl加水分解⁶⁸およびアルカリ加水分解⁶⁹が存在するが一般的ではない。アルカリ加水分解の弱点は、システイン、セリン、アルギニン、トレオニンといったアミノ酸が部分的、あるいは完全に分解されることである。そこで、3-NTの測定には酵素による蛋白質分解が広く用いられてきた。本法の潜在的欠点は、蛋白質分解酵素自身の消化により、含有するチロシンと3-NTを放出する点にある。

3-ニトロチロシンの定性的解析

プロテオミクス研究において、質量分析装置へのサンプル導入法へは2つの方法がよく知られている。

MALDI（matrix-assisted laser desorption）によるイオン化とTOF（time of flight）による分析法、2つ目はESI（electrospray ionization）によるイオン化と、イオントラップ・三重極/四重極/ハイブリッド四重極型TOF分析法の組み合わせ等である。ただし、MALDI-TOFによる3-NT含有ペプチド解析には、あ

る問題点がある。すなわち、MALDI-TOF において、3-NT 含有ペプチドのニトロ基から光化学反応により酸素が1つ又は2つ消失することがあることである。しかしながら、どちらの分析装置を用いても、蛋白質を含むサンプルは二次元電気泳動により供され、PVDF 膜への転写後のウェスタンブロットで特異抗体と反応する蛋白質スポットと同じ位置にあるゲル上の蛋白質スポットを分析にかけることになり、同じスポットに複数の蛋白質が存在することや、疎水性蛋白質は二次元電気泳動では検出しにくい等の問題がある。

3-NT のプロテオームでの検出で注意しなければならないのは、チロシン含有ペプチドがトリプトファンを含んでいるときである。トリプトファンもニトロ化することが知られている⁷⁰。また、プロテオーム解析での3-NT の検出は、蛋白質によっては、全てのペプチドを検出するわけではないので、3-NT が検出されないからといって3-NT が標的蛋白質にないとはいえない。

3-ニトロチロシンの予防医学的応用と最近のトピックス

Beckman らが、最初にヒト動脈の粥状硬化症組織病変で3-NT 抗体と反応する免疫組織化学的局在をみるとして以来、動脈硬化病変で3-NT の増加、iNOS の発現、プロスタサイクリン合成酵素のチロシンのニトロ化等が証明され、動脈硬化による血栓形成との関連性が説明されている^{40,71,72}。血清中3-NT 濃度の上昇及び血清蛋白質 apo A1の3-NT 量の上昇が心血管疾患のリスクをあげることや、抗酸化作用とコレステロール合成阻害作用のある治療薬スタチンが血清3-NT 濃度を低下させることが報告されている^{31,73,74}。血清中の3-NT 濃度の上昇は、多くの心疾患³⁷、糖尿病⁵³、腹部大動脈瘤⁷⁵、肺癌⁷⁶、人工透析患者⁷⁷等において認められている。糖尿病における血清3-NT 上昇は、スタチンにより低下することが指摘されている⁷⁸。疾患までには至らないが、喫煙者や肥満者では、血清中3-NT の上昇が見られる^{79,80}。このことは、3-NT の測定値がメタボリック症候群等の生活習慣病予備軍で上昇し始める可能性があり、疾病予防のためのバイオマーカーとなる可能性を示している。しかしながら、心血管疾患の一部の研究は GC-MS/MS 又は LC-MS/MS で測定されているが^{31,73,74}、ほと

んどはウェスタンブロットイング又は ELISA によるものであり、今後、疾患におけるリスク評価には MS による測定値との比較が必要になる。

最近、3-NT 又は3-NT 含有ペプチドが、2価の銅イオンとチトクローム P 450還元酵素存在下、DNA を酸化修飾し 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を生成することが報告された⁸¹。すなわち、3-NT よりH₂O₂の産生が生じ、3-NT が発がんに関与していることを推測している。また、ドーパミン産生神経培養細胞は、遊離型3-NT を添加するとこれを取り込み、ドーパミン代謝を阻害し、アポトーシスを起こすことが報告されている。遊離型の3-NT が神経細胞毒性を引き起こすことから、パーキンソン病への関与が示唆されている⁸²。一般的には、ニトロ化蛋白質は、蛋白質分解をふくむ処理機構により分解されるが、特定の条件下で、もしニトロ化された蛋白質が存在し続けると、自己の抗原認識反応を誘導し、自己免疫疾患をもたらす可能性がある。実際に、自己のペプチドに反応性を持たないトランスジェニックマウスにおいて、ニトロ化されたペプチドは強い免疫反応を惹起することが明らかになっている⁸³。

おわりに

3-NT の生成から測定法、さらにバイオマーカーとしての可能性について述べた。翻訳後修飾の一つとして蛋白質アミノ酸チロシンのニトロ化は、より正確な測定法の確立によりメタボリックシンドローム等の生活習慣病のリスク評価と抗酸化剤による疾病予防に重要な意味を有してくると思われる。

文 献

- 1) Chen Z, Zhang J and Stamler JS : Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. Proc Natl Acad Sci USA (2002) **99**, 8306-8311.
- 2) Bredt DAS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR and Snyder SH : Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature (1991) **351**, 714-718.
- 3) Nathan C and Xie QW : Nitric oxide synthase : roles, tolls, and controls. Cell (1994) **78**, 915-918.
- 4) Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB and Bloch KD : Cloning and expression of a DNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. J Biol Chem (1992) **267**, 22694.
- 5) Halliwell B and Gutteridge JMC : Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York (1999).

- 6) Bauer PM, Buga GM, Kukuto JM, Pegg AE and Ignarro LJ : Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* (2001) **276**, 34458-34464.
- 7) Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ and Stamler JS : Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* (1999) **284**, 651-654.
- 8) Stamler JS, Lamas S and Fang FC : Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* (2001) **106**, 675-683.
- 9) Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marchall HE and Stamler JS : Protein S-nitrosylation : purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) **6**, 150-166.
- 10) Crow JP and Beckman JS : The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* (1995) **196**, 57-73.
- 11) Prutz WA, Moning H, Butler J and Land EJ : Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems : oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch Biochem Biophys* (1985) **234**, 125-134.
- 12) Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B and Cross CE : Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem* (1997) **272**, 7617-7625.
- 13) Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B and van der Vliet A : Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* (1999) **38**, 2590-2600.
- 14) Beckman JS and Koppenol WH : Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite : the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* (1996) **271**, C1424-1435.
- 15) Ischiropoulos H : Biological tyrosine nitration : a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* (1998) **356**, 1-11.
- 16) Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Sayder SH and Zweier JL : Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 6770-6774.
- 17) Ogino K, Nakajima M, Kodama N, Kubo M, Kimura S, Nagase H and Nakamura H : Immunohistochemical artifact for nitrotyrosine in eosinophils or eosinophil containing tissue. *Free Radic Res* (2002) **36**, 1163-1170.
- 18) Kodama N, Kambayashi Y, Kubo M, Nobukuni Y, Kimura S, Nakamura H and Ogino K : Induction of myeloperoxidase and nitrotyrosine formation in a human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1. *Cell Biochem Funct* (2004) **22**, 105-112.
- 19) Wu W, Chen Y and Hazen SL : Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem* (1999) **274**, 25933-25944.
- 20) Kilinc K, Kilinc A, Wolf RE and Grisham MB : Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration : no need for peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **285**, 273-276.
- 21) Chen Y-R, Chen C-L, Chen W, Zweier JL, Augusto O, Radi R and Mason RP : Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical. *J Biol Chem* (2004) **279**, 18054-18062.
- 22) Kambayashi Y, Hitomi Y, Kodama N, Kubo M, Okuda J, Takemoto K, Shibamori M and Ogino K : pH profile of cytochrome c-catalyzed tyrosine nitration. *Acta Biochim Pol* (2006) **53**, 577-584.
- 23) Ogino K, Kodama N, Nakajima M, Yamada A, Nakamura H, Nagase H, Sadamitsu D and Maekawa T : Catalase catalyzes nitrotyrosine formation from sodium azide and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* (2001) **35**, 735-747.
- 24) MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS and Thompson JA : Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 11853-11858.
- 25) Schmidt P, Youhnovski N, Dalber A, Balan A, Arsic M, Bachshmid M, Przybyski M and Ullrich V : Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem* (2003) **278**, 12813-12819.
- 26) Gow A, Duran D, Thom SR and Ischiropoulos H : Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* (1996) **333**, 42-48.
- 27) Lemerrier JN, Padmaja S, Cueto R, Squadrito GL, Uppu RM and Pryor WA : Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* (1997) **345**, 160-170.
- 28) Knowles ME, McWeeny DJ, Couchman L and Thorogood M : Interaction of nitrite with proteins at against pH. *Nature* (1974) **247**, 288-289.
- 29) Byun J, Henderson JP, Mueller DM and Heinecke JW : 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry* (1999) **38**, 19199-19208.
- 30) Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lusic AJ, Moore KP and Freeman BA : Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine

- nitration. *J Clin Invest* (2001) **108**, 1759–1770.
- 31) Zheng L, Nukuna B, Brennan M-L, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmit D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M and Hazen SL : Apolipoprotein A-1 is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* (2004) **114**, 529–541.
 - 32) Zhang H, Bgargava K, Kesler A, Feix J, Hogg N, Joseph J and Kalyanaraman B : Transmembrane nitration of hydrophobic tyrosyl peptides. *J Biol Chem* (2003) **278**, 8969–8978.
 - 33) Ischiropoulos H : Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) **305**, 776–783.
 - 34) Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB and Stadtman ER : Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthase mimics adenylation : relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 1776–1780.
 - 35) Blanchard-Fillion B, Souza JM, Friel T, Jiang GCT, Vrana K, Sharov V, Baron L, Schoneich C, Quijana B, Alvarez R, Radi S, Prezedborski S, Fernand GS, Horwitz J and Ischiropoulos H : Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem* (2001) **276**, 46017–46023.
 - 36) MacMillan-Crow LA and Thompson JA : Tyrosine modifications and inactivation of active manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* (1999) **366**, 82–88.
 - 37) Turko IV and Murad F : Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* (2002) **54**, 619–634.
 - 38) Zheng M, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD and Kinter M : Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* (2005) **280**, 38–47.
 - 39) Casoni F, Basso M, Massignan T, Gianazza E, Cheroni C, Salmona M, Bendotti C and Bonetto V : Protein nitration in a mouse of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* (2005) **280**, 16295–16304.
 - 40) Zou MH, Leist M and Ullrich V : Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine arteries. *Am J Pathol* (1999) **154**, 1359–1365.
 - 41) MacMillan-Crow LA, Greendorfer JS, Vickers SM and Thompson JA : Tyrosine nitration of c-SRC tyrosine kinase in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Arch Biochem Biophys* (2000) **377**, 350–356.
 - 42) Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S, Alexander CB, Rosenfeld SS and Frreman BA : Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. *J Biol Chem* (2003) **278**, 4194–4204.
 - 43) Giasson BI, Duda JE, Murry IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ and Lee V M-Y : Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* (2000) **290**, 985–989.
 - 44) Kanski J, Hong SJ and Schöneich C : 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* (2005) **280**, 24261–24266.
 - 45) Kanski J, Behring A, Pelling J and Schöneich C : Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins : effects of biological aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2005) **288**, H371–381.
 - 46) Gow AJ, Duran D, Malcom S and Ischiropoulos H : Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* (1996) **385**, 63–66.
 - 47) Souza JM, Choi I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, Obin M, Ara J, Horwitz J and Ischiropoulos H : Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* (2000) **380**, 360–366.
 - 48) Kuo W-N, Kocis JM and Mewar M : Protein denitration/modification by glutathione-s-transferase and glutathione peroxidase. *J Biochem Mol Biol Biophys* (2002) **6**, 143–146.
 - 49) Irie Y, Saeki M, Kamisaka Y, Martin E and Murad F : Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) **100**, 5634–5639.
 - 50) Kamisaka Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee YC and Murad F : An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) **95**, 11584–11589.
 - 51) Chen H-JC, Chen Y-M and Chang C-M : Lipoyl dehydrogenase catalyzes reduction of nitrated DNA and protein adducts using dihydrolipoic acid or ubiquinol as the cofactor. *Chem-Biol Interact* (2002) **140**, 199–213.
 - 52) Khan J, Brennand DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R and Jacobs M : 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* (1998) **330** (Pt 2), 795–801.
 - 53) Ceriello A, Mercuri F, Quagliario L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L and Taboga C : Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma : evidence of oxidative stress. *Diabetologia* (2001) **44**, 834–838.
 - 54) Oldreive C, Bradley N, Bruckdorfer R and Rice-Evans C : Lack of influence of dietary nitrate/nitrite on plasma

- nitrotyrosine levels measured using a competitive inhibition of binding ELISA assay. *Free Radic Res* (2001) **35**, 377-386.
- 55) Qu LN, Yang TB, Yuan YH, Zhong P, Yang B and Zhao H : A novel competitive ELISA for both free and protein-bound nitrotyrosine. *Hybrid Hybridomics* (2003) **22**, 401-406.
- 56) Ischiropoulos H, Beers MF, Ohnishi ST, Fisher D, Garner SE and Thom SR : Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J Clin Invest* (1996) **97**, 2260-2267.
- 57) Schwedhelm E, Tsikas D, Gutzki FM and Frolich JC : Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. *Anal Biochem* (1999) **276**, 195-203.
- 58) Tsikas D, Mitschke A, Suchy MT, Gutzki FM and Stichtenoth DO : Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2005) **827**, 146-156.
- 59) Soderling AS, Ryberg H, Gabrielsson A, Larstad M, Toren K, Niari S and Caidahl K : A derivatization assay using gas chromatography/negative chemical ionization tandem mass spectrometry to quantify 3-nitrotyrosine in human plasma. *J Mass Spectrom* (2003) **38**, 1187-1196.
- 60) Gaut JP, Byun J, Tran HD and Heinecke JW : Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture-negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* (2002) **300**, 252-259.
- 61) Crow JP and Ischiropoulos H : Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins : in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol* (1996) **269**, 185-194.
- 62) Jiao K, Mandapati S, Skipper PL, Tannenbaum SR and Wishnok JS : Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite. *Anal Biochem* (2001) **293**, 43-52.
- 63) Hensley K, Maitt ML, Pye QN, Stewart CA, Wack M, Tabatabaie T and Floyd RA : Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal Biochem* (1997) **251**, 187-195.
- 64) Ishida N, Hasegawa T, Mukai K, Watanabe M and Nishino H : Determination of nitrotyrosine by HPLC-ECD and its application. *J Vet Med Sci* (2002) **64**, 401-404.
- 65) Sodum RS, Akerkar SA and Fiala ES : Determination of 3-nitrotyrosine by high-pressure liquid chromatography with a dual-mode electrochemical detector. *Anal Biochem* (2000) **280**, 278-285.
- 66) Delatour T, Guy PA, Stadler RH and Turesky RJ : 3-Nitrotyrosine butyl ester : a novel derivative to assess tyrosine nitration in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Anal Biochem* (2002) **302**, 10-18.
- 67) Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H and Ames BN : Inflammation and NO(X)-induced nitration : assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) **94**, 3211-3216.
- 68) Yi D, Ingelse BA, Duncan MW and Smythe GA : Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids : generating valid results by eliminating artifactual formation. *J Am Soc Mass Spectrom* (2000) **11**, 578-586.
- 69) Frost MT, Halliwell B and Moore KP : Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J* (2000) **345** (Pt 3), 453-458.
- 70) Yamakura F and Ikeda K : Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* (2006) **14**, 152-161.
- 71) Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Acavitti MA, Tarpey MM and White CR : Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* (1994) **375**, 81-88.
- 72) Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL and Wijns W : Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* (1999) **41** : 465-472.
- 73) Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan M-L, Fu X, Goormastic M, Peace GL, Gokce N, Keaney JF, Penn MS, Sprecher DL, Vita JA and Hazen SL : Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* (2003) **289**, 1675-1680.
- 74) Shishehbor MH, Brennan M-L, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL and Hazen SL : Statins promote systemic antioxidants effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* (2003) **108**, 426-431.
- 75) Troxler M, Naseem KM and Homer-Vanniasinkam S : Increased nitrotyrosine production in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* (2004) **91**, 1146-1151.
- 76) Pignatelli B, Li C-Q, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Fortes C, Constantinescu V, Ischiropoulos H and Oshima H : Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* (2001) **61**, 778-784.
- 77) Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D and Siamopoulos KC : Tyrosine nitration in plasma proteins from patients

- undergoing hemodialysis. *Am J Kidney Dis* (2004) **44**, 286-292.
- 78) Ceriello A, Assaloni R, Ros RD, Maier A, Piconi L, Quagliari L, Esposito K and Giugliano D : Effect of atrovastatin and irebesartan, alone and combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetes patients. *Circulation* (2005) **111**, 2518-2524.
- 79) Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, Fujioka Y and Kunitomo M : Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest* (2005) **35**, 186-193.
- 80) Fenster CP, Darley-Usmar VM, Landaar AL, Gower BA, Weinsier RL, Hunter GR and Patel RP : Weight loss and race modulate nitric oxide metabolism in overweight women. *Free Radic Biol Med* (2004) **37**, 695-702.
- 81) Murata M and Kawanishi S : Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) **316**, 123-128.
- 82) Balanchard-Fillion B, Prou D, Polydoro M, Spielberg D, Tsika E, Wang Z, Hazen SL, Koval M, Przedborski S and Ischiropoulos H : Metabolism of 3-nitrotyrosine induces apoptotic death in dopaminergic cells. *J Neurosci* (2006) **26**, 6124-6130.
- 83) Herzog J, Maekawa Y, Cirrito TP, Illian BS and Unanue ER : Activated antigen-presenting cells select and present chemically modified peptides recognized by unique CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) **102**, 7928-7933.