

学位論文題名

脳細胞における一酸化窒素産生系とその調節機構に関する研究

学位論文内容の要旨

内皮由来弛緩因子（EDRF）として発見された一酸化窒素（NO）は広汎な生命現象に深く関与している。脳細胞における NO 合成酵素（NOS）としては、神経細胞由来の nNOS とグリア細胞由来の iNOS が存在し、産生される NO はシナプスの可塑性における逆行性伝達物質として、あるいは神経細胞死における原因物質として作用するとされている。nNOS および iNOS の活性調節機構ならびに酵素蛋白質の誘導機構については詳細に研究されているが、本酵素の基質結合活性の調節機構、および基質選択性についてはほとんど研究されていない。また、NO 産生機構についても NOS だけで完全に説明できるとは言えない。本研究においては、1) 脳 nNOS の基質親和性調節機能に対する補助因子の影響、2) 脳 nNOS と iNOS における L-Arg 含有ペプチド性神経伝達物質に対する基質特異性、3) 神経細胞のモデル細胞における新規 NO 産生系の可能性について検討した。

1、ラット小脳 nNOS に対する基質結合親和性の調節と NO 生成の調節

nNOS の活性発現に必須とされる補助因子の NO の生成過程における役割については明らかにされているが、酵素反応の第一ステップである基質と酵素の結合に対するこれら補助因子の調節的役割に関しては明らかにされていない。そこで、L-Arg 誘導体で NOS の基質結合領域に結合する [^3H]NNA を用いて nNOS への基質結合調節機構の検討を行った。nNOS 標本のラット小脳可溶性画分において、 BH_4 、NADPH および Ca^{2+} の非存在下で認められた [^3H]NNA 結合は Ca^{2+} または NADPH 単独では影響を受けなかったが、 BH_4 の存在下で増加し BH_4 /NADPH ではさらに増加した。しかしながら、以上の条件では [^{14}C]L-Arg からの [^{14}C]L-citrulline の産生は認められなかった。 BH_4 /NADPH に Ca^{2+} を添加してもさらなる [^3H]NNA 結合の増加は認められなかったが、この条件においてのみ [^{14}C]L-citrulline の産生が認められた。また、Scatchard 解析の結果、結合活性の増加は親和性の増加によることが明らかになった。このことは、 BH_4 と NADPH が [^3H]NNA 結合親和性に対してアロステリックな調節を行っていることを示唆している。ラット小脳より精製した nNOS においても同様な結果が得られた。以上の結果より、 BH_4 /NADPH は nNOS の基質親和性に対しアロステリックな調節を行っていること、 Ca^{2+} /CaM は nNOS の基質親和性には影響せず、酵素反応ステップのトリガーであることが明らかになった。

2、ラット脳 NOS イソ酵素 (nNOS と iNOS) における基質特異性の相違

NO は L-Arg の guanidino 基から生成されるため、L-Arg 含有ペプチド性神経伝達物質も NOS の基質になる可能性が考えられるが、脳 nNOS、iNOS に対する基質としての作用様式の相違の有無については明らかではない。そこで、各イソ酵素における [^3H]NNA 結合、NO 産生活性に対する内因性鎮痛物質 L-Tyr-L-Arg (L-kyotorphin: L-KTP) の作用について検討を行った。nNOS 標本であるラット小脳可溶性画分において L-KTP は [^3H]NNA 結合を抑制したが、L-KTP 分解酵素阻害薬の bestatin の添加により作用が減弱し、Hill 係数も低下した。L-KTP 拮抗薬である L-Leu-L-Arg でも同様な作用が認められたことから、この抑制作用が KTP 受容体を介するものではなく、L-Arg 含有ペプチドの分解により生じた L-Arg が nNOS への [^3H]NNA 結合に拮抗したと考えられる。一方、初代培養したラット脳グリア細胞をリポ多糖 (LPS) 処置して誘導して得た iNOS 標本においては、L-KTP の添加により nitrite の蓄積が確認されたが、この作用は bestatin によって影響を受けなかった。また、L-Leu-L-Arg においても同様であった。この結果は iNOS が L-Arg、L-KTP、L-Leu-L-Arg を基質として区別しないことを示している。以上の結果から、nNOS は L-Arg 含有ペプチドを基質とするとは考えにくい、iNOS は L-Arg 含有ペプチドを直接的に基質として利用し NO を産生し得ると考えられる。

3、NG108-15 細胞の 5-HT 応答性 cGMP 産生機構における NO の関与

神経細胞のモデルである NG108-15 細胞において、5-HT 誘発 cGMP 産生に、5-HT₃ 受容体を介して $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{NOS}$ 系により NO を産生する機構と、 Ca^{2+} 非依存性の未知の機構が報告されている。後者においては、ANP 受容体様膜結合型のグアニル酸シクラーゼ (GC) の可能性が示唆されているが詳細は明らかではない。そこで、この cGMP 産生機構の解明を試みた。NG108-15 細胞の膜画分を 5-HT 刺激しても cGMP 産生は認められず、少なくとも可溶性画分に存在する因子が必要であることが明らかになった。 Ca^{2+} 非存在下、無傷細胞において、可溶性 GC 阻害薬 methylene blue および細胞膜非透過性 NO 選択的捕捉薬 carboxyPTIO により 5-HT 誘発 cGMP 産生が阻害されたが細胞膜非透過性 NO 捕捉薬の oxyhemoglobin では阻害が認められなかったことから細胞内での NO 産生が強く示唆された。しかしながら、膜透過性 Ca^{2+} キレート薬 BAPTA-AM、CaM 拮抗薬 W-7、NOS 阻害薬 NAME、NIO、NMMA、NNA による抑制を受けなかったことから NOS の関与は否定された。一方、無刺激細胞において、細胞内に nitrate と nitrosothiol (RSNO) が検出され、5-HT 刺激により nitrate の増加とこれに呼応した RSNO の低下が認められた。細胞外においてはいずれの物質も検出されなかった。以上の結果から NG108-15 細胞の Ca^{2+} 非依存性の 5-HT 誘発 cGMP 産生機構においては、5-HT 刺激により細胞内に貯蔵された RSNO から NO が産生され可溶性 GC を活性化することにより cGMP が産生されることが考えられる。また、5-HT 刺激による nitrate と RSNO の濃度変化は、刺激後 2 - 2.5 分でピークになった後それぞれ初期値に向かって変化したことから、nitrate を RSNO に再生する機構の存在が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野村靖幸
副査	教授	長澤滋治
副査	助教授	徳光幸子
副査	助教授	高橋和彦

学位論文題名

脳細胞における一酸化窒素産生系とその調節機構に関する研究

申請者は、脳細胞における一酸化窒素（NO）産生系とその調節機構に関する研究を進めてきたが、今回、NO 合成酵素（NOS）の基質結合性における補助因子の役割、NOS イソ酵素における基質特異性の相違を明らかにし、さらに NOS を介さない新規な NO 産生系の存在を明らかにし、本学位論文として申請した。

内皮由来弛緩因子（EDRF）として発見された NO は広汎な生命現象に深く関与している。脳組織における NOS としては、神経細胞由来の nNOS とグリア細胞由来の iNOS が存在し、産生される NO はシナプスの可塑性における逆行性伝達物質として、あるいは神経細胞死における原因物質として作用するとされている。

nNOS の活性発現に必須とされる補助因子の NO 生成過程における役割については明らかにされているが、酵素反応の第一ステップである基質と酵素の結合に対するこれら補助因子の調節的役割に関しては明らかにされていない。そこで、L-Arg 誘導体で NOS の基質結合領域に結合する $[^3\text{H}]\text{N}^G\text{-nitro-L-arginine}$ (NNA) を用いて nNOS への基質結合調節機構の検討を行った。nNOS 標本のラット小脳可溶性画分において、 BH_4 、NADPH および Ca^{2+} の非存在下で認められた $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合は Ca^{2+} または NADPH 単独では影響を受けなかったが、 BH_4 の存在下で増加し BH_4/NADPH ではさらに増加した。しかしながら、以上の条件では $[^{14}\text{C}]\text{L-Arg}$ からの $[^{14}\text{C}]\text{L-citrulline}$ の産生は認められなかった。一方、 BH_4/NADPH に Ca^{2+} を添加してもさらなる $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合の増加は認められなかったが、この条件においてのみ $[^{14}\text{C}]\text{L-citrulline}$ の産生が認められた。ま

た、Scatchard 解析の結果、結合活性の増加は親和性の増加によることが明らかになった。このことは、 BH_4 と NADPH が $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合親和性に対してアロステリックな調節を行っていることを示唆している。ラット小脳より精製した nNOS においても同様な結果が得られた。以上の結果より、 BH_4/NADPH は nNOS の基質親和性に対しアロステリックな調節を行っていること、 Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) は nNOS の基質親和性には影響せず、酵素反応ステップのトリガーであることが明らかになった。

NO は L-Arg の guanidino 基から生成されるため、L-Arg 含有ペプチド性神経伝達物質も NOS の基質になる可能性が考えられるが、脳 nNOS、iNOS に対する基質としての作用様式の相違の有無については明らかではない。そこで、各イソ酵素における $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合、NO 産生活性に対する内因性鎮痛物質 L-Tyr-L-Arg (L-kyotorphin : L-KTP) の作用について検討を行った。nNOS 標本であるラット小脳可溶性画分において L-KTP は $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合を抑制したが、L-KTP 分解酵素阻害薬の bestatin の添加により作用が減弱し、Hill 係数も低下した。L-KTP 拮抗薬である L-Leu-L-Arg でも同様な作用が認められたことから、この抑制作用が KTP 受容体を介するものではなく、L-Arg 含有ペプチドの分解により生じた L-Arg が nNOS への $[^3\text{H}]\text{NNA}$ 結合に拮抗したと考えられる。一方、初代培養したラット脳グリア細胞をリポ多糖 (LPS) 処置により誘導して得た iNOS 標本においては、L-KTP の添加により nitrite の蓄積が確認されたが、この作用は bestatin によって影響を受けなかった。また、L-Leu-L-Arg においても同様であった。この結果は iNOS が L-Arg、L-KTP、L-Leu-L-Arg を基質として区別しないことを示している。以上の結果から、nNOS は L-Arg 含有ペプチドを基質とするとは考えにくい、iNOS は L-Arg 含有ペプチドを直接的に基質として利用し NO を産生し得ると考えられる。

神経細胞のモデルである NG108-15 細胞において、5-HT 誘発 cGMP 産生に、5-HT₃ 受容体を介して $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{NOS}$ 系により NO を産生する機構と、 Ca^{2+} 非依存性の未知の機構が報告されている。後者においては、ANP 受容体様膜結合型のグアニル酸シクラーゼ (GC) の可能性が示唆されているが詳細は明らかではない。そこで、この cGMP 産生機構の解明を試みた。NG108-15 細胞の膜画分を 5-HT 刺激しても cGMP 産生は認められず、少なくとも可溶性画分に存在する因子が必要であることが明らかになった。 Ca^{2+} 非存在下、無傷細胞において、可溶性 GC 阻害薬 methylene blue および細胞膜透過性 NO 選択的捕捉薬 carboxyPTIO により 5-HT 誘発 cGMP 産生が阻害されたが細胞膜非透過性 NO

捕捉薬の oxyhemoglobin では阻害が認められなかったことから細胞内での NO 産生が強く示唆された。しかしながら、膜透過性 Ca キレート薬 BAPTA-AM、CaM 拮抗薬 W-7、NOS 阻害薬 NNA、N^G-nitro-L-arginine methyl ester、N^G-imino-ethyl-L-ornithine、N^G-monomethyl-L-arginine による抑制を受けなかったことから NOS の関与は否定された。一方、無刺激細胞において、細胞内には nitrate と nitrosothiol (RSNO) が検出され、5-HT 刺激により nitrate の増加とこれに呼応した RSNO の低下が認められた。細胞外においてはいずれの物質も検出されなかった。以上の結果から NG108-15 細胞の Ca²⁺ 非依存性の 5-HT 誘発 cGMP 産生機構においては、5-HT 刺激により細胞内に貯蔵された RSNO から NO が産生され可溶性 GC を活性化することにより cGMP が産生されと考えられる。また、5-HT 刺激による nitrate と RSNO の濃度変化は、刺激後 2 - 2.5 分でピークになった後それぞれ初期値に向かって変化したことから、nitrate を RSNO に再生する機構の存在が示唆された。このように、5-HT 情報伝達に NOS を介さない新規な NO 産生系の存在が示唆された。

以上、審査委員会は、本論文を NOS の基質結合性における補助因子の役割、NOS イソ酵素における基質特異性の相違、さらに、NOS を介さない新規な NO 産生系の存在に関して新知見を得た内容であると判定し、博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認めた。