



Title	Nitric Oxide Synthase from Rat Colorectum : Purification, Peptide Sequencing, Partial PCR Cloning and Immunohistochemistry
Author(s)	徐, 漢兢
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38921
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	徐 漢 斌
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Nitric Oxide Synthase from Rat Colorectum: Purification, Peptide Sequencing, Partial PCR Cloning and Immunohistochemistry (ラット大腸の一酸化窒素合成酵素：精製，ペプチドシーケンス，PCR による部分クローニング及び免疫組織化学)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 多 田 道 彦 教 授 三 木 直 正

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

血管弛緩作用を持つ物質として発見された一酸化窒素（NO）は、NO合成酵素によりL-アルギニンから産生され、神経系では情報伝達物質、免疫系では抗菌及び抗腫瘍作用などの多様な生理活性をもつ分子である。また、自律神経や腸管などの末梢神経系では非アドレナリン性、非コリン性作動物質として作用していると考えられている。大腸でもNO産生が確認されているが、その合成酵素については十分に解明されていない。そこで、ラット大腸のNO合成酵素の酵素学的性質を明らかにするために本酵素を精製し、部分アミノ酸配列およびPCRによる部分cDNA配列を決定した。更に、腸管の末梢神経系でのNO合成酵素の役割を知るために抗体を作製し、それを用いてラット大腸でのNO合成酵素の免疫組織学的検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

1) ラット大腸からのNO合成酵素の精製

NO合成酵素はラット大腸より3段階のカラムクロマトグラフィを用いて6,500倍以上の精製度と3.4%の収率で精製された。精製酵素はSDS-PAGEで160 kDaの単一バンドを示し、比活性は328 nmol/min/mgであった。また、亜硝酸イオンをGriess反応により定量したところ34.4 nMの亜硝酸イオンが産生され、この時38.5 nMのシトルリンが産生されることから精製酵素がNO合成酵素であることが確認された。

2) ラット大腸由来NO合成酵素の酵素学的性質

精製されたNO合成酵素のL-アルギニンに対する K_m 及び V_{max} の値はそれぞれ $2.19 \mu M$ 、 84 nmol/min/mg であった。また、この酵素は完全活性発現のためにNADPH, Tetrahydro-L-biopterin, FADなどのCofactorを要求し、 Ca^{2+} , Calmodulin依存性であった。L-アルギニン誘導体による阻害実験ではNNAがNMAより6倍以上強い阻害を示し、脳型酵素に類似していた。

3) ラット大腸由来NO合成酵素のペプチドシーケンス及びPCR増幅

約6 μg の精製された酵素をリシルエンドペプチダーゼ消化後、逆相クロマトグラフィーにより12個のペプチドを単離し、121個の部分アミノ酸配列を決定したところ、2つのアミノ酸が報告されているラット脳型NO合成酵素と異なっていた。そこで脳と大腸からのRNAを用いて逆転写酵素によりcDNAを合成し、この2つのアミノ酸を挟むように合成した2組のプライマーを用いてPCR法で増幅させた。その結果、大腸のNO合成酵素と同じアミノ

酸が脳のNO合成酵素でも確認されたことから、2つのアミノ酸の違いは用いたラットの種類によるものであり、大腸で発現しているNO合成酵素の遺伝子は脳のもものと同一であることが示唆された。

4) ラット大腸の免疫組織学的考察

大腸のNO合成酵素は量的に少なく大量精製が困難なため、それと相同性が高く、しかも大量に存在する脳から精製し、これを家兎に免疫することによって抗体を作製した。この抗体を用いてイムノブロットを行った結果、脳と大腸では同じ160 kDaのバンドが反応したが、IFN- γ とLPSで刺激したRAW 264.7細胞では反応しなかった。従って、脳型と大腸のNO合成酵素の抗原性はよく似ているが、RAW 264.7細胞で発現される誘導型NO合成酵素は非常に異なることが分かった。本抗体を用いたラット大腸の免疫組織学的検索にて内輪筋と外縦筋の間の神経節が強く染色され、筋層の神経線維も染色が認められた。

[総括]

1) ラット大腸から精製したNO合成酵素はSDS-PAGEで160 kDaを示し、Ca²⁺、Calmodulin依存性の酵素であることが明らかになった。

2) ラット大腸由来NO合成酵素の部分アミノ酸配列及びPCR増幅による部分cDNA配列などから、大腸で発現されているNO合成酵素は脳型と同じ遺伝子に由来することが示唆された。

3) 抗ラット脳型抗体を用いたラット大腸の免疫組織学的検索の結果、腸管ではNO合成酵素によって産生されたNOが非アドレナリン性、非コリン性作動物質として作用して平滑筋の弛緩反応に関わっていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素(NO)は神経系では情報伝達物質、免疫系では抗菌および抗腫瘍作用などの多様な生理活性をもつ分子である。また、自律神経や腸管などの末梢神経系では非アドレナリン性、非コリン性作動物質として作用していることが示唆されているが、その合成酵素については十分に解明されていない。

本論文は、腸管の末梢神経系でのNO合成酵素の役割を検索する目的で、ラット大腸からNO合成酵素を精製し、酵素学的性質、部分アミノ酸配列およびPCRによる部分cDNA配列を決定するとともに抗ラット脳型抗体を作製し、ラット大腸でのNOの合成酵素の局在を免疫組織学的に検討したものである。3段階のカラムクロマトグラフィを用いて6,500倍以上の精製度と3.4%の収率で精製された酵素はSDS-PAGEで160 kDaの単一バンドを示した。Cofactorなどの要求性やCa²⁺、Calmodulin依存性、L-アルギニン誘導体による阻害実験、亜硝酸イオンの産生、抗ラット脳型抗体を用いたイムノブロットで脳と大腸では同じ160 kDaのバンドが反応したことなどから抗原性がよく似たNO合成酵素であることが推定された。ラット大腸より精製した酵素をリシルエンドペプチダーゼ消化後、逆相クロマトグラフィーにより12個のペプチドを単離し、121個の部分アミノ酸配列を決定したところ、2つのアミノ酸が報告されているラット脳型NO合成酵素と異なっていたので脳と大腸からのRNAを用いて逆転写酵素によりcDNAを合成し、この2つのアミノ酸を挟むように合成した2組のプライマーを用いてPCR法で増幅させた。その結果、大腸のNO合成酵素と同じアミノ酸が脳のNO合成酵素でも確認されたことから、2つのアミノ酸の違いは用いたラットの種類によるものであり、大腸で発現しているNO合成酵素の遺伝子は脳のもものと同一であることが示唆された。また、本抗体を用いたラット大腸の免疫組織学的検索にて内輪筋と外縦筋の間の神経節が強く染色され、筋層の神経線維も染色が認められたことから本酵素が大腸でも発現されていることを証明した。以上の研究結果は自律神経や腸管などの末梢神経系に脳と非常に類似したNO合成酵素が発現されていること、また、その局在からNOが非アドレナリン性、非コリン性作動物質として作用して平滑筋の弛緩反応に関わっていることを示唆している点で重要であり、博士論文に値するものと認める。