



Title	Purification and characterization of nitric oxide synthase-activating factor
Author(s)	奥村, 明子
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39322
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	おく 村 明 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 9 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Purification and characterization of nitric oxide synthase-activating factor (一酸化窒素合成酵素の活性化因子の精製と性質)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 川 八 郎 (副査) 教 授 岡 本 光 弘 教 授 吉 川 和 明

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

一酸化窒素 (NO) は、神経伝達作用、血管弛緩作用、免疫担当細胞における細胞障害作用など種々の生理作用を有する物質である。生体内で NO は、一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって L-arginine より産生される。脳、神経細胞における NOS は、NO を産生することにより、細胞間の情報伝達や、自律神経系を介した循環系の調節に関与すると考えられている。私はラット尿中の血圧調節物質を探索中に本酵素を活性化する物質 (nitric oxide synthase activating factor ; NOSAF) が存在するのを見出したので、本物質を精製し、その性質を検討中、FAD (flavin adenine dinucleotide) にも同様の性質を有することを明かにし得たので、両者の性質を比較しつつ作用機構について検討を加えたので、その成果を報告する。

【方法】

1) NOSAF の精製 Deoxycorticosterone acetate-salt 高血圧ラットの尿を塩酸酸性下にて煮沸し、遠心後、限外ろ過法を利用して分子量 1 万以下の分画を得た。更にそれを Sep-pak, reversed-phaseHPLC にかけて、部分精製した。ラット脳、心臓、肝臓、副腎、腎臓からの精製は、それぞれを煮沸した後 Polytron を使用して、ホモジナイズし、遠心、限外ろ過後、Sep-pak, reversed-phaseHPLC を用いて行なった。牛副腎からは、reversed-phaseHPLC の代わりに anion exchange column を用いた FPLC で精製を行なった。

2) NOS 酵素標品の調整 ラット脳から 2', 5'-ADP agarose affinity chromatography, MonoQ anion exchange column chromatography により部分精製した。NOS 活性は、生成したシトルリン量、または、nitrite と nitrate 量を指標として測定した。

3) 血圧の測定 ウレタン麻酔下に、ラットの側脳室に NOSAF あるいは FAD を投与し、その時の血圧を大腿動脈カテーテルと transducer を用いる観血的方法により測定した。それと同時に心拍数を測定した。

4) cGMP の測定 ラット胎児より調製した脳神経細胞を初代培養した。この細胞を NO にて刺激すると cGMP 量が増加するので、この系を NO 産生量の指標として用いて、3-isobutyl-1-methylxanthine 存在下で NOSAF または FAD で刺激した時の cGMP 量を測定した。

【成績】

1) ラット尿と上記のテストした、すべての臓器に NOSAF が検出された。特に、湿重量あたりに換算すると副腎に

高濃度に存在し、牛副腎にもその存在が認められた。

2) NOSAF は側脳室投与により、血圧降下、心拍数低下を誘導し、また、脳神経細胞に対しては細胞内 cGMP 量を上昇させた。

3) NOSAF は MonoQ column chromatography における溶出パターン、phosphodiesterase 処理による活性の消失、溶液の呈色などの性質が FAD と極めて類似した。

4) FAD は神経型 NOS の酵素活性を上昇させた。この効果は NOS の補酵素である FAD を加えて、NOS をホロ酵素とした状態においても認められた。その活性化機構は、基質である L-arginine による負の協同性を FAD が解除することにあることが酵素レベルで証明された。

5) FAD は神経細胞内 cGMP の産生を促進させた。この効果は NOS の阻害剤である N^G-monomethyl-L-arginine の前投与で消失した。

6) FAD は、側脳室投与により心拍数の低下を伴う血圧降下を誘導した。この作用は N^G-monomethyl-L-arginine の前投与で消失した。また、FAD の投与で交感神経活性が低下することが観察され、この効果は N^G-monomethyl-L-arginine の前投与で抑制された。

【総括】

以上の結果より、下記のことが示唆された。

1) 生体内には NOS の酵素活性を上昇させ、血圧降下作用、神経細胞内 cGMP 産生促進作用を有する物質 (NOSAF) が存在し、特に副腎に高濃度に存在している。

2) NOSAF と FAD は類似の性質を示す。

3) FAD は補酵素としての役割以外に神経型 NOS を活性化する作用、神経細胞内 cGMP の産生促進作用を有する。

4) FAD は NO を介して交感神経活性を低下させることにより、血圧を低下させ、循環系に影響を与える。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は神経伝達作用、血管弛緩作用など種々の生理作用を有する一酸化窒素 (NO) を合成する酵素である。本研究ではラットの生体内に存在し NOS を活性化して循環系の調節に関与する物質の一種がフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) であることを証明した。また、FAD が NOS を補酵素としての役割以外にアロステリックアクティベーターとして作用すること、神経細胞内 cGMP 産生促進作用を有すること、NO を介して交感神経活性を低下させることにより血圧を低下させることを示した。このように FAD の新しい機能を証明し、臨床上の応用の可能性を示唆したことは価値ある業績である。本研究は博士 (医学) の学位授与に値すると認められる。