



Title	Immunochemical characterization and measurement of neuronal type nitric oxide synthase in human neuroblastoma NB-OK-1 cell using novel anti-synthetic peptide antibody and specific immunoassay system
Author(s)	荒川, 行生
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44494">https://hdl.handle.net/11094/44494</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	荒川　ゆき生
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17360号
学位授与年月日	平成14年12月3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	I mmunochemical characterization and measurement of neuronal type nitric oxide synthase in human neuroblastoma NB-OK-1 cell using novel anti-synthetic peptide antibody and specific immunoassay system (ヒト神経芽細胞腫NB-OK-1細胞の神経型一酸化窒素合成酵素について: 新しい抗合成ペプチド抗体と特異イムノアッセイ系による解析)
論文審査委員	(主査) 教授 黒川 信夫
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 遠山 正彌

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

一酸化窒素(NO)は、生体内で一酸化窒素合成酵素(NOS)によって合成され、神経系、心血管系、呼吸器系または免疫系等において、生理学的または病態生理学的に重要かつ多様な役割を演じていることが明らかにされてきた。しかしながら、NOの化学的不安定性はその測定の、ひいてはNO研究の隘路となっている。そこで、NOの直接測定に代わりNOSの酵素活性がNOの増減の一つの指標となっているが、NOSには3種のアイソフォームの存在が知られている。本研究では、まず、これらのうち神経系に特徴的に発現するとされる神経型NOS(nNOS)に注目し、抗合成ペプチド抗体をもちいて、他の誘導型および内皮型NOS(iNOSおよびeNOS)と区別してこれを特異的に測定できるイムノアッセイ系の確立を目指した。さらに、これら抗体とアッセイ系により、ヒト神経芽細胞腫NB-OK-1細胞のnNOSタンパクの特性を明らかにするとともに、神経ペプチドpituitary adenylate cyclase activating polypeptide(1-38)(PACAP38)がその発現におよぼす影響について解析した。

#### 【方法】

- ①ヒトnNOSの部分アミノ酸配列(998-1024)に対する抗合成ペプチド抗体(RYI19)を家兎に作製し、本抗体をもちいてヒトまたは動物組織の免疫染色およびイムノプロットを行った。
- ②合成ペプチドnNOS(998-1024)、<sup>125</sup>I-nNOS(998-1024)および抗体RYI19をもちいて、ヒトnNOSのラジオイムノアッセイ(RIA)系を確立した。
- ③10%ウシ胎児血清添加RPMI1640培地にてNB-OK-1細胞を培養し、細胞に発現したnNOS免疫活性(nNOS-IR)を、抗体RYI19をもちいたイムノプロット法およびRIA法により検出・定量した。また、培地中にPACAP38を添加して24時間培養し nNOS-IR 発現におよぼす影響を調べた。betamethasone phosphate(BP)またはdibutyryl-cAMP(db-cAMP)についても、同様に培地に添加してその影響をみた。このとき、同時に、NOS酵素活性を<sup>3</sup>H-L-arginineの<sup>3</sup>H-L-citrullineへの変換量として測定した。

## 【結果】

- ①抗体 RYI19 はヒト空腸、モルモット回腸およびラット大脳の神経細胞を特異的に染色した。すなわち、これら組織の免疫染色において、過剰量の抗原ペプチドは抗体 RYI19 を中和したが、過剰量のヒト iNOS および eNOS タンパクは抗体 RYI19 を中和しなかった。なお正常ウサギ血清はこれら組織を免疫染色しなかった。また、抗体 RYI19 によるラット小脳抽出物のイムノプロットでは 160 kDa の nNOS タンパクを特異的に検出した。
- ②ヒト nNOS に特異的な RIA 系を確立した。本アッセイ系においては、合成ペプチドによる標準曲線はヒト腎抽出物およびラット小脳抽出物と良好な平行性を示す一方、ヒト iNOS および eNOS タンパクとは交差反応しなかった。また、39.3~629.0 fmol の測定範囲において、検体の実測値は計算値の 96.9~102.7% を示し、その変動係数は 7 %未満であった。
- ③NB-OK-1 細胞において、nNOS タンパクの分子サイズは 160 kDa であり、その発現量は 180 fmol/10<sup>6</sup> cells で NOS 酵素活性量に比例した。この酵素の  $K_m$  は 4.88 μM、 $V_{max}$  は 4.34 pmol/min/mg protein であった。また、PACAP38 は、NB-OK-1 細胞の nNOS-IR および酵素活性を  $10^{-10}$  および  $10^{-9}$  M では増加させ、 $10^{-7}$  M では逆に減少させた。 $10^{-6}$ ~ $10^{-3}$  M の db-cAMP は高濃度の PACAP38 と同様、両活性を減少させた。一方、 $10^{-5}$ ~ $10^{-3}$  M の BP は、両活性を用量依存的に減少させた。

## 【総括】

ヒト nNOS の部分アミノ酸配列に相当する合成ペプチドをもちいて、これに対する抗合成ペプチド抗体を作製した。nNOS に対する本抗体の特異性は、ヒトまたは動物組織の免疫組織化学およびイムノプロットにより証明した。本抗体と合成ペプチド抗原をもちいてヒト nNOS に対する高感度かつ特異的な RIA 系を確立することができた。このアッセイ系は組織検体中のヒト nNOS タンパクの正確な微量定量を可能にし、これによりヒト神経芽細胞腫 NB-OK-1 細胞中の nNOS タンパクの存在を初めて示すことができた。また、PACAP38 は、その濃度に応じて、本細胞中の nNOS-IR および酵素活性を共に増加または減少させることを明らかにした。この結果は、NB-OK-1 細胞の分化/増殖における PACAP38 の作用を考慮すると、nNOS によって産生される内因性の NO が細胞の分化/増殖に関与する可能性を示唆するものであった。さらに、BP の両活性への抑制作用をも含めて、本研究により得られた知見は、細胞内 nNOS の酵素活性の調節について、従来いわれているリン酸化/脱リン酸化の他に、明らかにタンパク量の増減による機構が存在することを示した。また、同時に、本研究によって確立されたヒト nNOS 特異 RIA 系の有用性を裏付けるものであった。

## 論文審査の結果の要旨

一酸化窒素（NO）は種々の生理学的および病態生理学的過程に関与し、神経系においてもメッセンジャー分子として重要な役割を演じているとされる。本研究においては、ヒト生体において NO の合成を担う酵素である一酸化窒素合成酵素（NOS）のうち、神経系に広く発現する神經型 NOS（nNOS）に注目し、nNOS の部分アミノ酸配列（998-1024）に相当する合成ペプチドとこれに対する抗合成ペプチド抗体をもちいて、ヒト nNOS の高感度で特異的なイムノアッセイ系を確立した。また、本イムノアッセイ系により、ヒト神経芽細胞腫 cell line の NB-OK-1 細胞が産生する nNOS を測定し、その特性を求めた。さらに神経ペプチドである pituitary adenylyate cyclase activating polypeptide (PACAP) 38 が、NB-OK-1 細胞の nNOS 産生におよぼす影響についても解析した。

その結果、NB-OK-1 細胞が nNOS を産生すること、同細胞が nNOS 研究の有用なモデルとなり得ることが初めて示された。また、nNOS により合成される内因性の NO が NB-OK-1 細胞の分化/増殖に関与する可能性を示唆する知見を得、さらに、細胞内 nNOS の酵素活性の調節に関し、タンパク量の増減による機構の存在を示した。ひるがえって、本研究で確立したイムノアッセイ系は nNOS の新しい微量測定手段として極めて有用であり、その有用性はこれらの解析によっても十分裏付けられるものであった。

以上、本研究で得られた成果は医科学に貴重な貢献をなすものであり、よって本論文は学位の授与に値するものと考えられる。