

S72

生理活性物質NOとその生体内における合成制御

NO合成酵素はいかにして調節されているか？

(日本医科大学、一生化、*都臨床研、炎症) ○堀 弘幸、

岩崎俊雄、倉橋容子、林 陽子、松村智裕、梅田真郷*、西野武士

1980年代に血管弛緩因子として同定された一酸化窒素 (NO) が、血管内皮系のみならず、生体内の様々な組織で生理活性を示すことが明らかとなってきた。脳神経系では神経伝達物質として記憶や学習のメカニズムの一環として機能し、神経系の発生、分化との関連も指摘されている。また、神経細胞はNOを含めた低分子ラジカル化合物に対する感受性が高く、過剰なNOは神経細胞死を惹起するとも報告されている。さらに免疫細胞系では抗菌、抗ウイルス物質として作用し、時にはその高い反応性のため、組織障害を誘発しエンドトキシンショックや炎症の一因ともなる。

生体内でのNOの産生は一酸化窒素合成酵素 (Nitric Oxide Synthase; NOS, EC 1.14.13.39) と総称される酵素群による。一酸化窒素合成酵素はその生体内分布、構造、遺伝子調節機構、酵素の活性化機構からおよそ三群に分類される。すなわち、構成型酵素の神経型 (neuronal NOS; nNOS) と血管内皮型 (endothelial NOS; eNOS)、および免疫系をはじめ生体内の様々な組織でみられる誘導型 (inducible NOS; iNOS) である。これら三酵素はいずれも分子量13-16万のサブユニットからなる二量体酵素でアルギニン、酸素、NADPHを基質としシトルリン、NO、NADP⁺を産生する。各サブユニットは1個のヘム、FMN、FADおよび0.5-1個のテトラヒドロビオプテリンを酵素活性に必須な補欠分子族として含有し、ヘム、テトラヒドロビオプテリンを含むP450型ヘムドメインとFMN、FADを含むP450リダクターゼドメイン、および二つのドメインを接続するカルモジュリン結合部位から構成される。これら三つの酵素のうち、nNOSとeNOSはカルモジュリンを介してカルシウムで活性化されるが、iNOSはカルモジュリンと強固に結合しておりカルシウムによる活性化を必要としない。

我々はラット小脳のnNOSの精製法を検討し、その過程において、本酵素がカルシウム存在下では迅速に失活するという現象をみいだした。カルシウムイオンはすでに述べたようにnNOSにとって活性化物質であり、精製過程において同イオンが失活を惹起するという現象は生体内における何らかの活性調節機構を反映しているものと考えられた。当初、プロテアーゼによる分解がもっとも疑われたが、この失活現象が可逆的であることから否定された。さらに、カルシウムイオンに対する反応性が酵素精製のステップ上で変化することから、小脳ホモジェネート中に存在する何らかの物質が酵素の安定性に関与しているものと考えられた。

我々はウシ大脳ホモジェネートを初発材料として、この仮想物質を検索し、nNOSを安定化し、喪失したカルシウム応答性を回復させる物質を得た。この安定化物質は脂溶性であり、かつ耐熱性である。また、ホスホリパーゼC処理によって活性を消失することから、リン脂質の一種であると考えられた。そこで、二次元薄層クロマトグラフィの手法を用い、該当するスポット化合物の検索を行なった。得られた化合物のRf値はホスファチジルエタノールアミンのRf値と一致し、マススペクトル分析により分子量775であることが確認された。そこでホスファチジルエタノールアミンに特異的に結合するペプチド、Ro09-0198でこの物質を処理したところ、nNOSを安定化する活性が完全に喪失することが示された。これらの結果から、nNOSにはリン脂質、生体膜を介したカルシウム依存性の活性調節機構があるのではないかと現在考えている。

Role of nitric oxide and its production. Regulation of nitric oxide synthase.

○Hori, H., Iwasaki, T., Kurahashi, Y., Hayashi, Y., Matsumura, T., Umeda, M.*, and Nishino, T. (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, *Inflammation Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

Key Words: Nitric Oxide Synthase; Calcium; Phospholipid