

Molecular cloning and characterization of Ca^[2+]-dependent inducible nitric oxide synthase from guinea-pig lung

著者	白戸 学
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 2159, 1999.3.25 On t.p. "[2+]" is superscript Joint authors: Tohru Sakamoto ... et al. Offprint. Originally published in: Biochemical journal, v. 333, pp. 795-799, 1998 Includes supplementary treatises
発行年	1999
その他のタイトル	モルモット肺由来Ca ^[2+] 依存性誘導型一酸化窒素合成酵素のクローニングと解析
URL	http://hdl.handle.net/2241/1620

氏名(本籍)	しらと 白戸	まなぶ 学(岩手県)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第2,159号	
学位授与年月日	平成11年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Molecular cloning and characterization of Ca ²⁺ -dependent inducible nitric oxide synthase from guinea-pig lung (モルモット肺由来Ca ²⁺ 依存性誘導型一酸化窒素合成酵素のクローニングと解析)	
主査	筑波大学教授	医学博士 山本雅之
副査	筑波大学教授	医学博士 三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士 山下亀次郎
副査	筑波大学助教授	医学博士 永瀬宗重

論文の内容の要旨

(目的)

一酸化炭素(Nitric Oxide; NO)は、生体の恒常性維持および防御機構において多彩な機能を発揮しているガス状のラジカル分子で、3種類のNO合成酵素から産生される。サイトカイン等で発現誘導される誘導型NO合成酵素(inducible NO synthase; iNOS)は多量のNOを持続的に産生することから、炎症時の組織障害への関与が示唆されている。気道に炎症性疾患を有する患者において、呼気中のNO濃度の上昇が報告されているが、肺のiNOS発現調節に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では、モルモット肺よりiNOS遺伝子をクローニングし、その生化学的性質および組織における発現調節機構について検討した。また、急性呼吸不全症候群(ARDS)や喘息の病態モデルにおける、その発現の変動についても検討した。

(方法)

(1) モルモットiNOS cDNAのクローニング: モルモット肺から抽出したRNAを鋳型として、種を超えて保存されているiNOS遺伝子特異的プライマーを用いたRT-PCR法により全長iNOS cDNAを作製し、全塩基配列を決定した。

(2) 新規iNOSの解析: リポポリサッカライド(LPS)による組織におけるiNOS発現誘導をノザン解析により検討した。また、クローニングしたiNOSの活性を、COS細胞に導入することにより検討した。さらに、発現させたNOS活性に及ぼすCa²⁺キレーター、各アイソフォーム特異的阻害剤およびカルモデュリン阻害剤の影響をそれぞれヒトiNOSと比較検討した。

(3) 肺と大腸におけるiNOS mRNAの発現調節機構の検討: iNOS遺伝子の転写活性およびmRNA安定性に対するLPSの影響を検討した。転写活性はrun-on法により測定した。mRNA安定性については、転写阻害剤投与後のiNOS mRNA発現量の経時変化をノザン解析により調べた。さらに、肺および大腸に発現しているmRNAをRACE(replicon amplification of cDNA ends)法とノザンプロットにより解析した。

(4) 病態モデルにおけるiNOSアイソフォーム発現の解析: 肺におけるiNOS mRNA局在を、iNOS cDNAをプローブとして、*in situ*ハイブリダイゼーション法により検討した。また、肺胞Ⅱ型上皮細胞におけるiNOS mRNAの変動を、モルモットにLPSを投与してARDSモデルを作製後、肺胞Ⅱ型上皮細胞を単離し、iNOS mRNAの発現をノザンプロットにより解析することで、検討した。さらに抗原感作したモルモットに抗原を吸入させ、

6時間後の肺におけるiNOS mRNAの変動をRT-PCR法で解析した。抗iNOS抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

(結果)

(1) モルモットiNOS cDNAのクローニング：クローン化したcDNAはアミノ酸配列で既知のiNOSと約80%の相同性が認められたが、他のアイソフォームに対しては相同性は40%以下であった。

(2) iNOSの解析：肺と大腸に恒常的な発現が認められた。LPS刺激により腎臓、脾臓、大腸では発現の増加が観察されたのに対し、肺では抑制が認められた。肺でのLPSによる発現抑制には、用量および経時の変化が観察された。発現実験において、得られたcDNAのNOS活性はヒトiNOSと異なりCa²⁺キレーター添加で強く抑制された。一方、iNOS阻害剤及びカルモジュリン阻害剤添加では、ヒトiNOSと同様に選択的な活性の抑制が認められた。

(3) 肺と大腸におけるiNOS mRNA発現調節機構の検討：iNOS遺伝子転写に関して、肺ではLPSにより増減は認められなかったが、大腸では1.8倍に増加した。mRNA安定性については、肺においてLPSにより分解の亢進が観察されたが、大腸での変化は認められなかった。また、肺と大腸にTGF- β 1の定常的発現が観察された。その発現レベルは肺の方が5倍高く、さらにLPS刺激により肺での発現レベルは2倍に増加した。RACE法により5'-非翻訳領域の長さが約50bp異なる2つのmRNAが肺と大腸で検出された。ノザン解析では、肺では短い方のmRNAが発現し、大腸では長い方のmRNAが発現していることが明らかになった。

(4) 病態モデルにおけるiNOSアイソフォーム発現の解析：*in situ*ハイブリダイゼーション解析の結果、肺胞II型上皮細胞にiNOS mRNAの発現が観察された。ARDSモデルでの肺胞II型上皮細胞におけるiNOS mRNAの解析の結果、肺胞II型上皮細胞に定常的なiNOS mRNAの発現が観察され、ARDSの病態下で発現の減少が認められた。また、喘息モデルでの検討の結果、抗原吸入6時間後の肺に発現の増加が観察された。抗原吸入後の肺においては、気道上皮細胞にiNOSの発現が観察された。

(考察)

クローニングしたcDNAは既知のiNOSとの相同性の比較、薬理的検討およびLPSによる誘導実験によりiNOS homologueであると考えられる。しかしながら、このiNOSの活性は、Ca²⁺依存性であった。さらに、LPS刺激により肺においてiNOS mRNAの減少が観察された。これらのことから、このcDNAは新しいiNOSアイソフォームである可能性がある。LPS刺激後のiNOS mRNA発現の相違について、肺と大腸で比較検討した結果、肺での減少はmRNA分解の亢進に基づくことが、また、大腸での発現増大は転写の亢進に基づくことがそれぞれ明らかとなった。このiNOSには2種類のmRNAが存在し、肺にはLPSにより発現が抑制される短いmRNAが、大腸にはLPSにより発現が増強される長いmRNAがそれぞれ選択的に発現し、各組織において異なる発現調節を受けている可能性が考えられる。

病態モデルで各iNOSアイソフォームの発現を解析した結果、短いmRNAはARDSモデルでその発現が減少した。一方、長いmRNAは抗原吸入により発現が増加したことから、主に気道上皮で発現され、喘息の病態へ関与している可能性が考えられる。今後、これらの病態におけるNOの関与について明らかにするためにはmRNAレベルでの変化の他に、蛋白質あるいは活性レベルでの検討を行う必要があると思われる。

本研究ではモルモットiNOS cDNAの一次構造を決定し、このiNOS mRNAに2つのアイソフォームが存在することを明らかにした。さらに炎症時に、これらのアイソフォームが組織特異的な発現調節を受け、異なる病態へ関与している可能性を見いだした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、モルモット誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) のcDNAクローニングを行い、その構造、多型性、お

よび、病態モデルにおける発現を調べたものである。一酸化窒素（NO）は生体の恒常維持および防御機構において多彩な機能を発揮している分子である。誘導型NO合成酵素（inducible NO synthase；iNOS）は、多量のNOを持続的に産生することから、炎症時の組織障害への関与が示唆されている。しかし、肺のiNOS発現調節に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では、モルモット肺よりiNOS遺伝子をクローニングし、その生化学的性質および組織における発現調節機構について検討した。また、急性呼吸不全症候群（ARDS）や喘息の病態モデルにおける、その発現の変動についても検討した。データの中には、まだ解析途上のものもあるが、本論文は、iNOS研究の上での新知見を含んでいる。すでに、本論文の一部はBiochemical Journal誌に公表されている。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。