

## ラット小脳一酸化窒素合成酵素の反応機構の基礎研究

岩永 剛

広島大学大学院生物圏科学研究科

### Kinetic Studies on the Successive Reaction of Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase

Tsuyoshi IWANAGA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

#### 要 旨

#### 序 論

一酸化窒素 (NO) は、脳神経系における重要な情報伝達物質であるとともに、血管の拡張による血圧調節とマクロファージの生体防御反応に関与する作用物質でもあり、近年注目を集めている。生体内の NO は、一酸化窒素合成酵素 (NOS) により産生される。NOS は、1.5 分子の NADPH と 2 分子の酸素分子を消費して、アルギニンを基質としてシトルリンと NO を合成する。NOS の反応は、NADPH から供給される電子を要求する酸素添加反応であり、P450 の反応と類似する。NOS は、NADPH 結合部位を有する還元酵素領域と、ヘム鉄を含む酸素添加酵素領域から構成され、その融合部位にカルモジュリン結合部位が存在する。細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇により生成するカルシウムイオン・カルモジュリン複合体が NOS に結合して、NOS における還元酵素領域から酸素添加酵素領域への電子伝達を促進する。NOS の反応では、第一段階の反応でアルギニンから水酸化アルギニンを生成し、第二段階の反応で水酸化アルギニンからシトルリンと NO を生成するとされていた。しかし、中間代謝物と考えられている水酸化アルギニンの生成が少量であるため、その反応機構の直接的な証明はなされていなかった。また、その 2 段階の反応の制御機構を明らかにすることは、NO の生理的役割を解明するためにも重要である。本論文では、大腸菌により大量発現させ精製したラット小脳の神経型 NOS (nNOS) を用いて酵素反応の速度論的な解析を行い、以下の 4 点を明らかにした。

#### 実験方法

nNOS は、pCWnNOS プラスミドを用い、大腸菌 BL21 を形質転換させて発現し、カラムクロマトグラフィーを順次行って精製した。溶液中の nNOS 濃度は、一酸化炭素が nNOS のヘムに結合す

ると生ずる差スペクトルを測定することで決定した。反応迅速停止法には、ユニソク製の反応迅速停止装置(MX-200)を使用した。反応開始前に基質となる $[^3\text{H}]$ -アルギニンと過剰量のnNOSとを入れておくことで酵素・基質複合体を形成させ、非放射性アルギニンとNADPHを含む反応開始液をミキサー1で迅速に混合することで反応を開始した。数十ミリ秒後、反応コイル中の反応液を追い出し液で押し出し、ミキサー2で反応停止液と瞬時に混ぜることにより反応を停止した。反応生成物は、ODSカラムを用いたHPLCにより分離し、 $[^3\text{H}]$ -放射性生成物を定量した。

## 第一章 ラット小脳一酸化窒素合成酵素の反応中間体の同定と2段階連続反応の証明

基質であるアルギニンがnNOSに対し大過剰存在する定常状態下の反応では、反応中間体はほとんど検出できない。そこで、数十ミリ秒の時間精度のある反応迅速停止装置を用いて、 $[^3\text{H}]$ -ラベルした基質の大部分が酵素に結合する条件下で酵素反応を開始し、数十ミリ秒間隔でその生成物を回収し、検出することで、反応中間体の同定を行った。酵素反応1サイクルの経時変化を観測すると、最初に反応中間体として $[^3\text{H}]$ -ラベルした水酸化アルギニンが増加し、その減少とともに最終生成物として $[^3\text{H}]$ -ラベルしたシトルリンが増加した。この経時変化を、中間代謝物が酵素から解離しないで最終生成物になる連続反応機構として解析した結果、実測値と理論曲線が非常に良く一致した。これらの結果から、nNOSは、反応中間体である水酸化アルギニンが酵素からほとんど解離することがない連続的な2段階の反応によって、アルギニンからシトルリンとNOを生成することが証明された。

## 第二章 ラット小脳一酸化窒素合成酵素の2段階連続反応の律速段階

反応迅速停止法により得られたデータを、nNOSの反応機構から導かれる1サイクルの反応速度式を用いて解析した結果、アルギニンから水酸化アルギニンへの変換反応の速度定数( $k_1$ )、水酸化アルギニンからシトルリンとNOへの変換反応の速度定数( $k_3$ )、水酸化アルギニンの酵素からの解離の速度定数( $k_2$ )を求めた。さらに $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ を定常状態の速度式に代入し最終生成物であるシトルリンの酵素からの解離の速度定数( $k_4$ )を算出した。 $k_4$ は、反応速度定数として最も小さい値を示した。各反応速度定数の温度依存性をアレニウスの活性化エネルギーの式に代入し、各反応速度定数の活性化エネルギーを算出した結果、 $k_4$ の活性化エネルギーが最も大きくなった。以上の結果から、nNOSの2段階連続反応の律速段階は、最終生成物であるシトルリンの酵素からの解離であることが示された。

## 第三章 NADPHからの電子の供与によるラット小脳一酸化窒素合成酵素の2段階連続反応制御機構

反応中間体である水酸化アルギニンは、尿素サイクルにおけるアルギナーゼに対するインヒビターであり、nNOSの2段階連続反応における水酸化アルギニンの生成を調節するメカニズムの解明は、重要な生理的意義を持っている。nNOSの2段階連続反応において、アルギニンから水酸化アルギニンへの変換反応ならびに水酸化アルギニンからシトルリンとNOへの変換反応は、NADPHからの電子を必要とするが、水酸化アルギニンの酵素からの解離では必要としない。NADPH濃度が減少すると、シトルリン生成活性の減少とともにシトルリンに対する水酸化アルギニンの生成量比は増大

した。反応迅速停止法を用いて低濃度NADPH条件下でのnNOS連続反応を解析した結果、アルギニンと水酸化アルギニン変換反応の速度定数 ( $k_1$ ,  $k_3$ ) は減少するが、水酸化アルギニンの解離の速度定数 ( $k_2$ ) はほとんど変わらない事が判明した。

NADP<sup>+</sup>は、NADPH還元酵素領域でNADPHと競合すると考えられる。NADP<sup>+</sup>濃度の増加により、定常状態のnNOSの反応ではシトルリン生成活性の減少とともに、シトルリンに対する水酸化アルギニン生成量比が増大した。高濃度NADP<sup>+</sup>条件下で1サイクルのnNOS連続反応を解析した結果、変換反応の速度定数は減少したが、反応中間体の解離の速度定数はほとんど変わらなかった。

以上の結果より、NADPH量の減少あるいはNADP<sup>+</sup>による競争阻害により電子の供給が減少すると、水酸化アルギニンのシトルリンへの変換反応速度は遅くなるが、水酸化アルギニンの酵素からの解離速度は変わらないため、シトルリンに対する水酸化アルギニンの生成量比が増大すると考えられる。NADPHからの電子伝達速度が、nNOSの2段階連続反応における水酸化アルギニンの生成を制御することが明らかになった。

#### 第四章 カルモジュリンによるラット小脳一酸化窒素合成酵素の2段階連続反応制御機構

カルシウムイオン・カルモジュリン複合体がnNOSに結合しなければ、nNOSの活性を発現しないことはよく知られている。しかし、nNOSの2段階連続反応に対するカルモジュリンの調節機構は明らかでなかった。カルシウムイオン存在下でカルモジュリン濃度を減少させると、nNOSのシトルリン生成活性は減少するが、シトルリンに対する水酸化アルギニンの生成量比は変化しなかった。低濃度、高濃度それぞれのカルモジュリン条件下で反応迅速停止法を用いてnNOS連続反応を解析した結果、アルギニン代謝の反応速度定数、 $k_1$ は、カルモジュリン濃度に関係なく一定であった。カルモジュリン濃度が低い場合、酵素反応1サイクルのアルギニン代謝量が少なくなった。反応1サイクルのアルギニン代謝量は、活性を示すnNOSの量を表すと考えられる。これらより、カルモジュリンはアルギニンの変換反応速度には影響を及ぼさないが、アルギニンを代謝する活性型nNOS濃度を変化させることが明らかになった。