

ラット新生子肝臓における一酸化窒素 (NO) 産生の 検出とその産生機序

犬飼 直人, 田中 和明, 滝沢 達也

麻布大学・獣医学部・動物工学研究室

[背景と目的]

新生子の肝臓では、胎生期の血液循環から成体の血液循環への再構築が生じており、この際にNOが関与していると推測されている。また、肝臓ではNO及び一酸化炭素(CO)により血流抵抗が低く維持されていることが知られている。しかし、フリーラジカルであるNOの半減期は0.1sから5sと短いため、生体内でのNO産生量を解析することは困難であり詳細は不明である。そこで、本研究では新生子期のラット肝臓におけるNO産生量を、スピントラップ・EPR法により解析し、また、内皮型NO合成酵素(eNOS)、ヘムを基質としてCOを産生するHeme Oxygenase-1(HO-1)及びHO-2の発現をReal Time-qPCR法やWestern Blot法により解析することによりNO産生機序を検討した。

[材料と方法]

生後2週齢から5週齢のラットにジチオカルバメート鉄錯体(Fe-DETC, 400 mg/Kg)を投与後、スピントラップ・EPR法により肝臓におけるNO産生量を解析した。次に、同時期のeNOS, HO-1及びHO-2のmRNA発現量をReal Time-qPCR法により定量した。さらにeNOSにおいてはタンパク質発現量をWestern Blot法により定量した。

[結果]

生後2週齢の肝臓においてスピントラップ・EPR法によりNO産生が認められ、このNO産生は3週齢に有意に増加(約10倍)してピークを示し、その後減少し5週齢では検出限界以下となった。eNOSタンパク質の発現は2週齢から3週齢まで変化は認められなかったが、5週齢では有意に減少していた。一方、HO-2のmRNA発現量に変化は認められないものの、HO-1のmRNA発現量は2週齢から3週齢にかけて有意に減少(約40%)していた。さらに、2週齢のラットにHO阻害剤である亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)を投与すると、NO産生が検出された。

[考察]

HOにより産生されたCOがeNOSの活性化を阻害することが知られている。このことから、生後2週齢から3週齢の肝臓におけるNO産生の上昇は、COを産生するHO-1の減少と関連していると考えられ、HO阻害剤ZnPPによりNO産生が検出されたことと一致していた。一方、3週齢から5週齢のNO産生の減少は、eNOSタンパク質の発現量の減少によって引き起こるものと推測された。