

胎盤における一酸化窒素 (NO) の産生と NO 合成酵素 (NOS) の発現

Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms and Detection of Nitric Oxide in Rat Placenta

池田 義則, 森 智絵美, 滝沢 達也

麻布大学獣医学部 動物工学研究室, 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

Yoshinori Ikeda, Chiemi Mori, Tatsuya Takizawa

Laboratory of Animal Biotechnology, School of Veterinary Medicine, Azabu University,
1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

Abstract: Nitric oxide (NO) production in the rat placenta (*pars fetalis placentae and decidua basalis*) was monitored and quantified by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using an iron complex with N-(dithiocarboxy) sarcosine (Fe-DTCS) as a NO trapping reagent. The expression of nitric oxide synthase (NOS) isoforms was also examined by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. The EPR spectrum of the placenta with Fe-DTCS trapping showed a triplet signal ($g = 2.038$) derived from an NO-Fe-DTCS complex. The heights of the NO-Fe-DTCS (a) and MnO (b) signals were simultaneously measured to calculate the ratio (a/b) of these signal heights used for the quantification of the NO production level. Although, the ratio of the signal heights of NO-Fe-DTCS and MnO did not vary significantly with gestational stage in the fetal placenta, the ratio was markedly decreased in the maternal placenta during the last few days of gestation. At the gestational stages examined, the level of NOS 2 (iNOS) mRNA expression was significantly higher than that of NOS 3 (eNOS) mRNA expression at any given stage in the fetal placenta, and the production pattern of NO was in good accordance with the expression pattern of NOS 2 in the maternal placenta. These results suggest that NOS 2 is the predominant producer of NO in the placenta and that NOS 2-generated NO plays significant roles in the maintenance of placental functions immediately before birth.

Key words: nitric oxide (NO), electron paramagnetic resonance (EPR), placenta

1. はじめに

一酸化窒素 (NO) は常温で気体のフリーラジカルである。1987年にNOは血管壁の内皮細胞で合成され、血管を弛緩させる因子 (内皮細胞由来血管弛緩因子: EDRF) の本体であると報告された^{1,2)}。その後、NOはL-arginineと酸素 (O_2) を基質としてNO合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) により産生され、生体内で多様な作用を有していることが明らかになった³⁾。

亜硝酸塩などのNO代謝産物が妊娠期間に増加することから、NOが妊娠維持に重要な作用を有していることが示唆されている⁴⁾。また、生理的、病態生理学的なNOの役割の解明には、濃度と分布を明らかにすることが重要と考えられているが、NOが不安定で寿命の短い分子であるため解析は困難であり、未解明な点が多数残されている^{5,6)}。

ラジカルは不対電子を有しているため、電子常磁性共鳴吸収 (electron paramagnetic resonance: EPR) 装置により解析が可能である。NOはラジカルである

ため原理的にはEPR装置により検出可能であるが、生体内寿命が短いため、解析は容易ではなかった。近年、ジチオカルバメート鉄錯体であるFe-DTCS (Fe-N-(dithiocarboxy)-sarcosine) を用いて、不安定なNOを安定なNO-Fe-DTCS錯体にトラップした後、EPR解析するスピントラップ-EPR法が報告^{7,8)}され、生体内寿命の短いNOをEPR法により解析することが可能となった。また、Takizawaら⁹⁾は、Fe-DTCSを用いたスピントラップ-EPR法によりNO産生を検出するだけでなく、定量化できることを報告している。

以上のことから、本研究ではスピントラップ-EPR法により胎盤におけるNO産生を解析し、定量的RT-PCR法によりNO産生に寄与するNOSアイソフォームを明らかにすることにより、妊娠後期の胎盤におけるNO産生の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

1) 供試動物

Crlj:Wistar ラット (日本チャールズリバー, 東京) を自家繁殖させて得た10~15週齢のF₁動物を用いた。水と飼料は自由に摂取させた。妊娠動物を得るために、雌雄ラットを一晩同居させ、翌日膣スメア内に精子が認められた日の正午を妊娠0.5日として起算した。本実験では、妊娠17.5日から21.5日の妊娠ラットを用いた。

2) 試薬

ジチオカルバメート鉄錯体としてN-(dithiocarboxy)-sarcosine (DTCS, 同仁化学, 熊本) を用いた。Fe-DTCS錯体の作製はTakizawaら⁹⁾の報告に従った。NOドナーとして4-methyl-2-[hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR1, 同仁化学, 熊本) を用いた。NO合成酵素(NOS)の阻害剤としてN^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Biomol, Plymouth Meeting, USA) を用いた。NO-Fe-DTCSの標準サンプルはNOR1とFe-DTCS錯体からTakizawaらの報告⁹⁾に従って作製した。

3) 電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 装置によるNO産生量の解析

NO由来のEPRスペクトルを検出、解析するため、電子常磁性共鳴吸収装置 (JES-TE2X, 日本電子, 東京) を用いた。サンプル採取30分前に、妊娠動物にスピントラップ剤Fe-DTCS (500 mg/kg as DTCS) を投与した。組織の採取時にはエーテル麻酔下で動物を開腹し、採材した。胎盤は胎盤胎子部 (*Pars fetalis placentae*) と胎盤母体部 (*decidua basalis*) に分けて採取した。採取した組織片は直ちに細切し、石英のEPR試料管に充填し液体窒素で凍結し、EPR解析に供した。EPR装置の測定条件はTemperature -196 °C, Microwave Power 10.00 mW, Modulation 100 kHz 0.32 mT, Center Field 330.0 mT, Sweep Width 50.0 mT, Sweep Time 4.0 min, Time Constant 0.30 sec とした。

また、NO由来のEPRスペクトルを定量化するために、サンプルのEPR解析と同時に酸化マンガン (MnO) 粉末をEPR解析し、両者のシグナルの高さの比を求めることによりNO-Fe-DTCSのEPRスペクトルを定量化した。

なお、一部のサンプルについては、組織で産生されているNOがNOS由来であることを確認するために、NOS阻害剤L-NAMEを前処置した妊娠ラットから、同様にサンプルを採取してEPR解析に供した。

4) 総RNAの抽出

妊娠17.5日から妊娠21.5日のラットをエーテル麻酔下で開腹し、前述と同様に採材した。組織片は液体窒素により急速凍結し、RNA抽出まで-80 °Cで保存した。

組織片からの総RNAの抽出はISOGEN (ニッポンジーン, 富山) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。抽出した総RNAは-80 °Cにて保存した。

5) 定量的RT-PCR法

oligo d(T)₁₂ プライマー (GIBCO BRL, 東京) と逆転写酵素 (Super Script III, invitrogen, 東京) を用いてcDNAを合成した。

用いたeNOSとiNOSおよびGAPDHの増幅プライマー配列⁹⁾は、eNOS (TCCCGAGCATCAAATACCTとTGGGCAGCATCACCTACGA), iNOS

(TTCACGACACCCTTCAACCACAA と CCATCCTCCTGCCCCACTTCCTC) GAPDH (TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGHC と CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC) であった。予備実験により PCR 産物が指数関数的に増幅をしているサイクル数の範囲を確認し、さらに、用いたサイクル数において添加した cDNA 量に比例して PCR 産物が増加する条件を求め、この条件で PCR 反応を行った。

PCR 反応後、PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I 溶液 (Takara, Kyoto) で 60 分間染色した。イメージアナライザー装置 (FLA-2000, 島津, 京都) により電気泳動像を取り込み、画像処理ソフト MacBas v2.5 (富士フィルム, 東京) を用いて PCR 産物を数値化した。得られ

た eNOS mRNA と iNOS mRNA の発現量は GAPDH mRNA の発現量により補正した。

6) 統計学的処理

得られたデータから平均, 標準偏差を求め, 一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて処理し, Scheffe's test を用いて有意差を求め, $P < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

3. 結果と考察

1) NO-Fe-DTCS の EPR スペクトル

スピントラップ-EPR 法の解析結果を図 1 に示した。Fe-DTCS と NO ドナーである NOR1 から作製した標準 NO-Fe-DTCS 錯体の EPR スペクトルを図 1 の

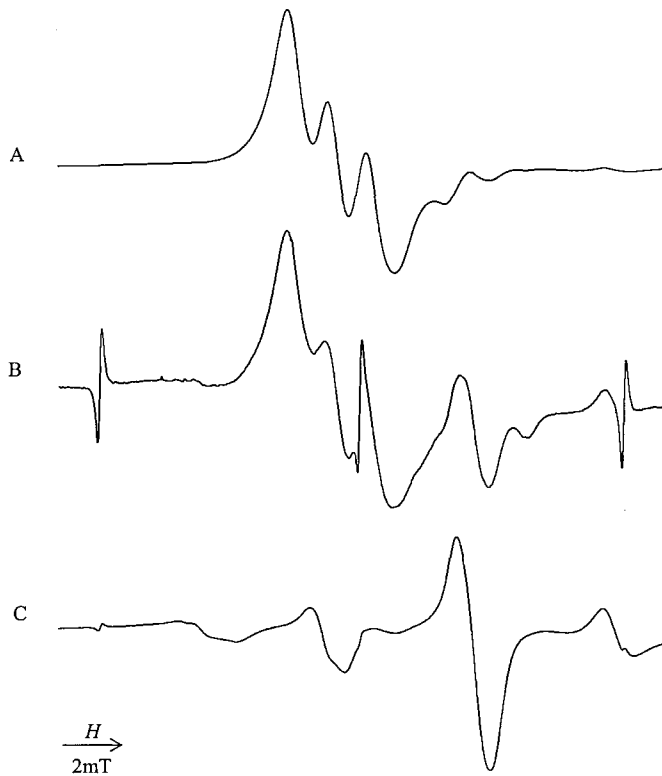


図1 EPR スペクトル

- A : NOR1 と Fe-DTCS を用いて作成した NO-Fe-DTCS の標準スペクトル
 B : Fe-DTCS 投与 (500mg/kg) 30 分後の妊娠 17.5 日の無処置ラット胎盤のスペクトル
 C : 妊娠 17.5 日のラット胎盤における L-NAME (100mg/kg) を投与 1 時間後のスペクトル

測定条件

Temperature -196°C , Microwave Power 10.00 mW,
 Modulation 100 kHz 0.32 mT, Center Field 320.0 mT,
 Sweep Width 10.0 mT, Sweep Time 4.0 min,
 Time Constant 0.30 sec

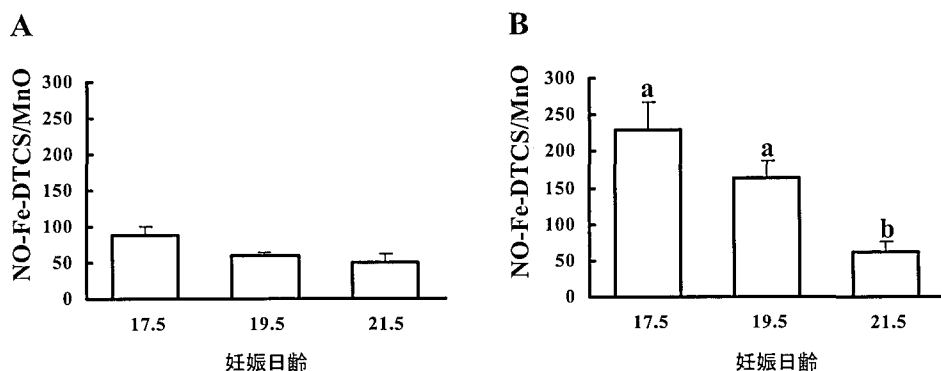


図2 スピントラップ-EPR法による胎盤におけるNO産生量の変化

A：胎盤胎子部におけるNO産生量，B：胎盤母体部におけるNO産生量

Fe-DTCS (500 mg/kg) 投与30分後の無処置ラットにおけるNO産生量は、NO-Fe-DTCSのシグナルの高さ (α) とMnOのシグナルの高さ (β) の比 (α/β) * 100を求め、平均値±S.E.で示した。a, b；各部位ごとに異なる文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

Aに示した。Takizawaらの報告⁹⁾と同様な、線対称な3本の超微細構造よりなるEPRスペクトル ($g = 2.038$) が認められた。また、NOS阻害剤であるL-NAME (100 mg/kg) をサンプリング60分前投与した動物から組織を採取すると、妊娠21.5日の胎盤では、NO-Fe-DTCSのEPRスペクトルが消失 (図1のC) しており、Cu-dithiocarbamate錯体由来のEPRスペクトル⁷⁾と同様なシグナルが認められた。さらに、組織から採取されたEPRスペクトル (図1のB) は、NO-Fe-DTCSの標準EPRスペクトルがCu-dithiocarbamate錯体由来のEPRスペクトルに挿入されたEPRスペクトルとして観察された。

2) NO産生量の解析

スピントラップ-EPR法によるNO産生量の変化を図2に示した。胎盤胎子部 (図2A) においては、今回検討した妊娠後期においてNO産生量に変化は認められなかった。一方、胎盤母体部 (図2B) においては、妊娠17.5日から妊娠21.5日にかけて、有意に減少していた。

3) 定量的RT-PCR

定量的RT-PCR法による、胎盤 (胎子部及び母体部) におけるiNOSmRNAとeNOSmRNA発現の変化を図3に示した。胎盤胎子部および母体部ともに、いずれの時期においてもiNOSmRNAとeNOSmRNAは発現していた。胎盤胎子部においては、iNOSmRNAとeNOSmRNAの発現に変化は認められ

なかった。一方、胎盤母体部においては、妊娠19.5日と比べて妊娠21.5日においてはiNOSmRNAの発現が有意に減少していた。eNOSmRNAの発現に妊娠時期による変動は認められなかった。

eNOSは細胞内の構成要素であり、刺激因子により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、カルモデュリン依存性にただちに活性化され、タンパク質1モルあたりのNO産生量は小さい¹⁰⁾。一方、iNOSはサイトカインや他の因子により転写レベルで調節されており、1モルあたりのNO産生量はeNOSと比べると約千倍である。またiNOSmRNAの発現からNO産生まである程度の時間が必要であり、Suzukiら⁷⁾はLPSによりiNOSを誘導させたラットにおいては、血中のNOレベルはLPS投与約7時間後にピークに達したと報告している。

妊娠17.5日から妊娠21.5日の胎盤におけるNO産生量をスピントラップ-EPR法により解析し、NO産生量を比較検討すると、胎盤胎子部では変動は認められなかったが、胎盤母体部では妊娠末期に向かって減少していた。その減少は胎盤母体部におけるiNOSmRNA発現の減少パターンと良く一致していた。これらのことから妊娠後期の胎盤におけるNO産生には、eNOSも関与しているものの、iNOSの寄与が大きいものと考えられた。iNOSノックアウトマウスにおいて、胎盤母体部の間質細胞の減少が報告されていること¹¹⁾から、胎盤において産生されているNOは、細胞の生存に重要であると考えられる。

エリスロポエチン遺伝子のエンハンサー領域に結

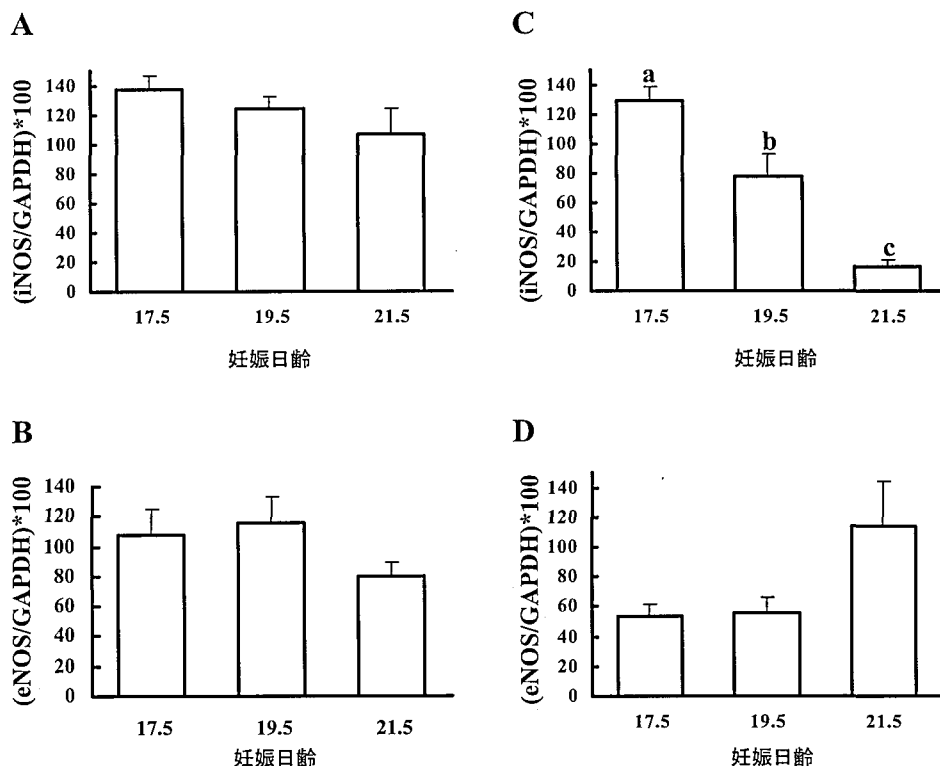


図3 胎盤における RT-PCR による iNOSmRNA と eNOSmRNA の発現量の変化

A, B : 胎盤胎子部における iNOSmRNA (A) と eNOSmRNA (B) の発現
 C, D : 胎盤母体部における iNOSmRNA (C) と eNOSmRNA (D) の発現
 各サンプルごとの (NOSmRNA/GAPDHmRNA) * 100 を求め、平均値 ± S.E. で示した。
 a, b, c ; 各妊娠日齢ごとに異なる文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

合して、低酸素下でエリスロポエチン遺伝子の転写を促進する転写調節因子として同定された HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) の結合部位が、iNOS 遺伝子の転写調節領域に存在し¹²⁾、低酸素下において飼育したラットの肺動脈では、HIF-1 を介在して iNOSmRNA の発現が上方制御されることが報告¹³⁾されている。また、妊娠末期においては、胎子の著しい成長等により胎盤は低酸素状態にあることが知られている。これらの報告を併せて考えると、妊娠末期の胎盤においては、血小板凝集抑制や血流量維持などに関与している NO 産生を分娩直前まで維持するために、iNOS 遺伝子の発現が転写レベルで調節されているものと考えられた。胎盤における NO 産生の調節機構や妊娠期間を通じた NO 産生とその調節機構の解明は、主にどの細胞で産生されているかなどの検討も含めてさらに検討すべき課題である。

以上のことから、妊娠 17.5 日から妊娠 21.5 日の胎盤胎子部における NO 産生に変動は認められなかったが、胎盤母体部において、この期間に NO 産生が

有意に減少しており、定量的 RT-PCR 法により、NO 産生の減少と一致して、iNOSmRNA 発現の減少が認められたことから、この時期の胎盤母体部における NO 産生には、eNOS も関与しているものの、iNOS の寄与が大きいものと考えられた。また、妊娠末期の胎盤においては、血小板凝集抑制や血流量維持などに関与している NO 産生を分娩直前まで維持するために、iNOS 遺伝子の発現が転写レベルで調節されているものと考えられた。

文 献

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., and Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526 (1987).
- 2) Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9265-9269 (1987).

- 3) Marletta, M. A., Nitric oxide: biosynthesis and biological significans. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 488-492 (1989).
- 4) Rosselli, M., Keller, P. J., and Dubey, R. K., Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiolgy of reproduction. *Human reproduction update*, **4**, 3-24 (1998).
- 5) Archer, S., Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB. J.*, **7**, 349-360 (1993).
- 6) 吉村哲彦. 1993. 「生体内NO測定法」「ファルマシア」**29**, 990-993.
- 7) Suzuki, Y., Fujii, S., Numagami, Y., Tominaga, T., Yoshimoto, T., and Yoshimura, T., *In vivo* nitric oxide detection in the septic rat brain by electron paramagnetic resonance. *Fre. Rad. Res.*, **28**, 293-299 (1998).
- 8) Yoshimura, T., Yokoyama, H., Fjii, S., Takayama, F., Oikawa, K., and Kamada, H., *In vivo* EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 992-994 (1996).
- 9) Takizawa, T., Yoshikawa, H., Yamada, M., and Morita, H., Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta. *Am. J. Physiol.*, **282**, C762-C767 (2002).
- 10) Forstermann, U., Boissel, J. P., and Kleinert, H., Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS II and NOS III). *FASEB. J.*, **12**, 773-790 (1998).
- 11) Burnett, T.G., Tash, J.S., and Hunt, J.S., Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice. *Reproduction*, **124**, 49-57 (2002).
- 12) Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., and Varesio, L. A., Hypoxia- responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* **182**, 1683-1693 (1995).
- 13) Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H., and Johns, R.A., Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **274**, L212-L219 (1998).