

胎盤および子宮における一酸化窒素 (NO) 産生の意義とその調節機構

*Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of
nitric oxide in term rat placenta and uterus*

— Possible role of NO on placental functions —

滝沢達也, 山本雅子

麻布大学大学院獣医学研究科

Tatsuya Takizawa, Masako Yamamoto

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: Nitric oxide (NO) production in the rat placenta and uterus was monitored and quantified by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using an iron complex with N-(dithiocarboxy) sarcosine (Fe-DTCS) as 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 NO-Fe-DTCS (a) and MnO (b) signal were simultaneously measured to calculate the ratio (a/b) of these signal heights as used for the quantification of the NO production level. The ratio of signal heights of NO-Fe-DTCS and MnO did not vary significantly with gestational stage in the placenta and uterus during the last few days of gestation. At the gestational stages examined, the level of NOS II (iNOS) mRNA expression was significantly higher than of NOS III (eNOS) mRNA expression at a given stage in the placenta. NOS II expression in term (day 21.5) placenta was significantly increased compared to that in preterm (day 19.5) placenta ($p < 0.01$, $n = 4$ or 5). These results suggest that NOS II is the predominant producer of NO in the placenta and that NOS II-generated NO plays significant roles in the maintenance of placental functions immediately before birth.

目 的

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フリーラジカル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)。

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、電子常磁性共鳴吸収 (electron paramagnetic resonance : EPR) 装置により解析する方法が報告されている (7, 8)。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、本研究はスピントラップ-EPR 法により胎盤と子宮における 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、妊娠後期の胎盤と子宮における NO 産生の意義とその調節機構を検討することを目的とした。

材料と方法

1) 供試動物および妊娠日齢の算定

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。妊娠動物を得るために、雌雄ラットを一晩同居させ、翌日膈スミ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。

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 合成酵素の阻害剤として N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Biomol, Plymouth Meeting, USA) を用いた。

3) 電子常磁性共鳴吸収 (EPR) 装置による解析

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。胎盤および子宮組織はシリンジを用いて石英の EPR 試料管へ押し出し、ただちに液体窒素で凍結し、EPR 解析に供した。EPR 装置の測定条件は Temperature 77.00K, 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 スペクトルを数値化するために、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。

4) 総 RNA の抽出

妊娠 19.5 日と妊娠 21.5 日のラットをエーテル麻酔下で開腹し、子宮と胎盤を採取した。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

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

eNOS と iNOS の特異的増幅プライマー (9) を用いて、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、その範囲で PCR 反応を行った。

PCR 反応後、PCR 産物を 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動し、SYBR Green I 溶液 (BMA50513, Rockland, USA) 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 (富士フイルム, v2.5, 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。

結果と考察

1) NO-Fe-DTCS の EPR スペクトルと定量的解析

Fe-DTCS と NO ドナーである NOR1 (同仁化学) から作製した標準 NO-Fe-DTCS 錯体の EPR スペクトルを Fig.1 に示した。Takizawa ら (9) の報告と同様な EPR スペクトルが認められた。また、妊娠 21.5 日の胎盤では、NO-Fe-DTCS の 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 スペクトルとして確認された (7)。

Fe-DTCS を用いたスピントラップ-EPR 法によるラ

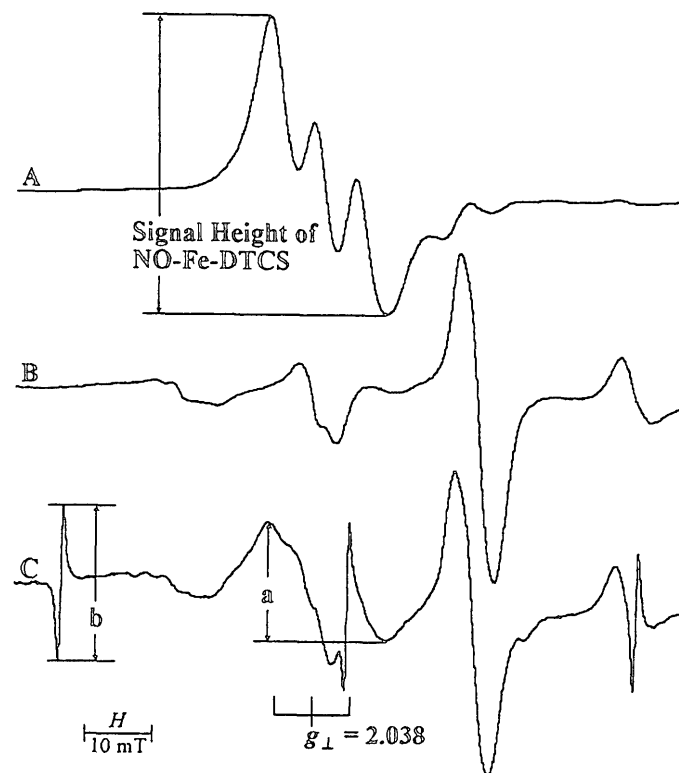


Fig. 1 A: EPR spectrum of a standard sample of NO-Fe-DTCS complex in fresh blood. A representative spectrum showing the triplet EPR signal ($g = 2.038$) is shown. The height of the NO-Fe-DTCS signal used for quantification of the level of NO production is indicated. B: EPR spectrum with Fe-DTCS trapping of the placenta after administration of L-NAME (100 mg/kg body wt) on day 21.5 of gestation. Fe-DTCS solution (500 mg/kg body wt as DTCS) was subcutaneously administered to the rat 0.5h after the L-NAME treatment. The placenta was taken from the anesthetized rat 0.5 h after administration of the Fe-DTCS solution. The placenta was transferred to an EPR tube frozen in liquid nitrogen for EPR measurement. The EPR signal was identified as the g_{\perp} signal of the Cu-dithiocarbamate complex (7). C: EPR spectrum of an NO-Fe-DTCS complex detected in the placenta on day 19.5 of gestation. Fe-DTCS solution (500 mg/kg as DTCS) was subcutaneously administered 0.5 h before sampling. The heights of NO-Fe-DTCS (a) and MnO (b) signal were simultaneously measured to calculate the ratio (a/b) of these signal heights as used for the quantification of the NO production level. The NO-Fe-DTCS signal was superimposed on the g_{\perp} signal of Cu-dithiocarbamate complex (7).

ット胎盤におけるNO産生の解析結果をFig. 2に示した。胎盤および子宮においては、妊娠19.5日から妊娠21.8日までのNO産生に妊娠時期による変動は認められなかった。

2) 定量的RT-PCR

結果をFig.3に示した。妊娠19.5日と妊娠21.5日の胎盤において、iNOSmRNAとeNOSmRNAの発現が認められた。妊娠19.5日と比べて妊娠21.5日においてはiNOSmRNAの発現が有意に増加していた。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産生量が多い。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。本実験ではNOSタンパク質の発現量の比較はしていないが、NO産生量はNOSタンパク質1モルあたりiNOSでもっとも多く、eNOSでもっとも少ないこと、さらに妊娠19.5日および妊娠21.5日のいずれにおいてもiNOSmRNAの発現がeNOSmRNAの発現よりも多いことから、妊娠後期の胎盤におけるNO

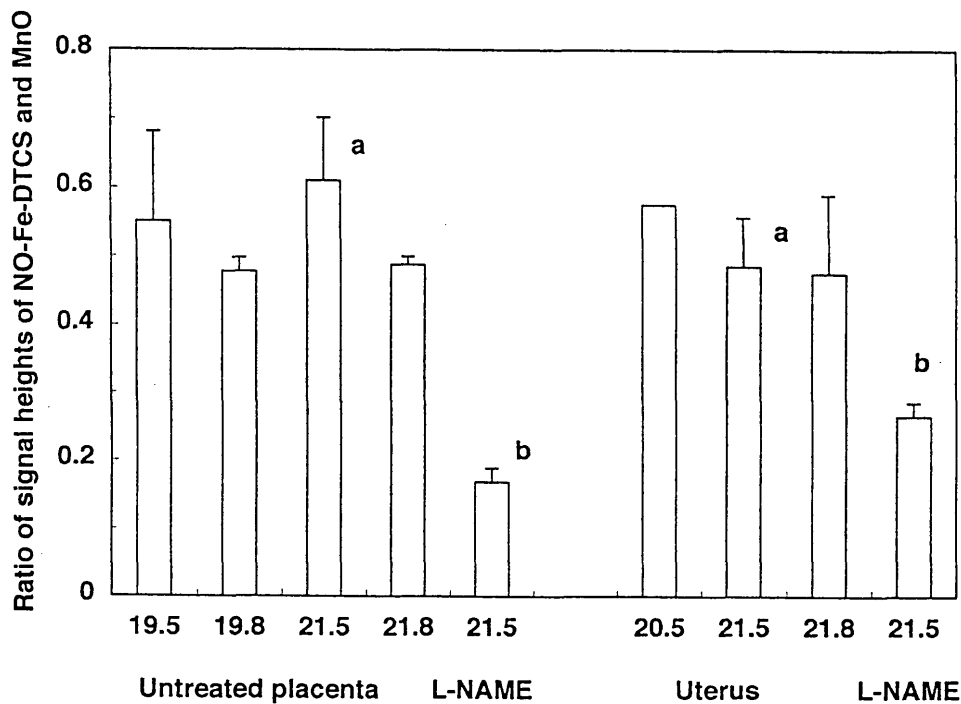


Fig. 2 Time course of the ratio of the heights of the NO-Fe-DTCS and MnO signals in the placenta and uterus. EPR spectra were recorded on days 19.5, 19.8, 21.5, and 21.8 of gestation. No significant differences were observed among the spectra observed at these times; however, the signal of NO-Fe-DTCS in the placenta of untreated rats was significantly higher than that in the placenta of rats pretreated with L-NAME (100 mg/kg; n=3-5, mean \pm SE). Bars with different letters differ significantly.

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。

一方、スピントラップ-EPR法によりNO産生量を比較検討すると、妊娠19.5日と妊娠21.5日の約8時間後に対応する妊娠19.8日と妊娠21.8日を含めて、いずれの時期においても胎盤のNO産生量に変動は認められなかった。エリスロポエチン遺伝子のエンハンサー領域に結合して、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(11)、低酸素下において飼育したラットの肺動脈では、HIF-1を介してiNOS mRNAの発現が上方制御されていることが報告されている(12)。また、妊娠末期においては、胎子の著しい生育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。子

宮における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さらに検討すべき課題である。

要約

妊娠の維持とその調節機構にNOが重要な役割を有していることが示唆されているが、NOは不安定なフリーラジカルであるため、解析が困難であった。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、電子常磁性共鳴吸収 (electron paramagnetic resonance: EPR) 装置により解析することにより、NO産生を検出し、定量化できることが報告されている。本研究では、このスピントラップ-EPR法により胎盤と子宮における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、妊娠後期の胎盤と子宮におけるNO産生の意義とその調節機構を検討した。

妊娠19.5日から妊娠21.8日の胎盤と子宮における

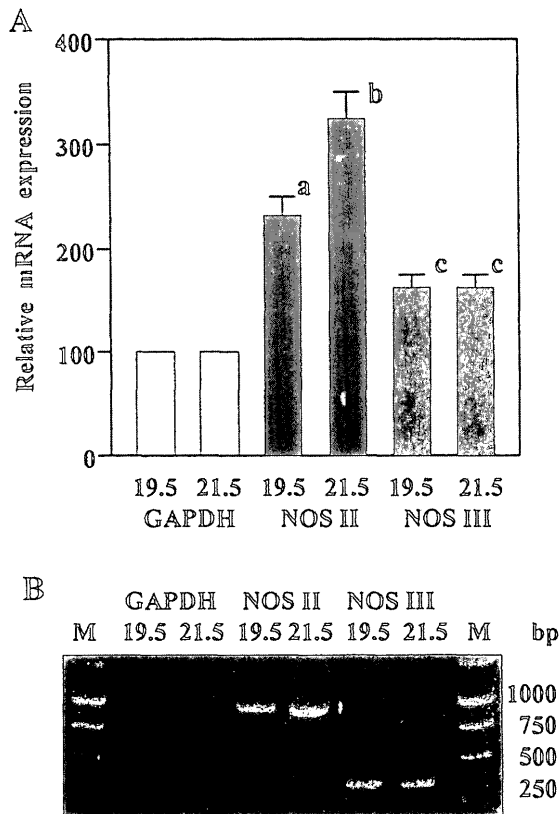


Fig. 3 Quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the expression of NOS II (iNOS) and NOS III (eNOS) in the placenta. A: the relative expression level was calculated as a percentage relative to the value of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-monophosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Data are expressed as the mean \pm SE of 4 or 5 individual experiments. Bars with different letters at the top differ significantly. B: a representative separation by 1.5% agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products amplified from total RNA extracted from rat placentas on days 19.5 and 21.5 of gestation. DNA size markers (M) are shown in the extreme left and right lanes. The expected product sizes were 950 bp for GAPDH, 912bp for NOS II and 373 bp for NOS III.

NO産生に変動は認められなかった。定量的RT-PCR法により、妊娠21.5日の胎盤においてはiNOSmRNAの発現が妊娠19.5日と比べて有意に増加していたが、eNOSmRNAの発現に妊娠時期による変動は認められなかったことから、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。以上の結果から、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. Nature 327:524-526, 1987.
- 2) Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 9265-9269, 1987.
- 3) Marletta M.A. Trends Biochem. Sci. 14: 488-492, 1989.
- 4) Rosselli M., Keller P.J. and Dubey R.K. Hum. Reprod. Update4: 3-24, 1998.
- 5) Archer S. FASEB.J. 7: 349-360, 1993.
- 6) 吉村哲彦 ファルマシア 29: 990-993, 1993.
- 7) Suzuki Y., Fujii S., Numagami Y., Tominaga T., Yoshimoto T. and Yoshimura T. Fre. Rad. Res. 28: 293-299, 1998.
- 8) Yoshimura T., Yokoyama H., Fujii S., Takayama F., Oikawa K. and Kamada H. Nat. Biotechnol. 14: 992-994, 1996.
- 9) Takizawa T., Yoshikawa H., Yamada M, and Morita H. Am. J. Physiol. 282: C762-C767, 2002.
- 10) Forstermann U., Boissel J.P. and Kleinert H. FASEB. J. 12: 773-790, 1998.
- 11) Melillo G., Musso T., Sica A, Taylor L.S., Cox G.W. and Varesio L.A. J. Exp. Med. 182: 1683-1693, 1995.
- 12) Palmer L.A., Semenza G.L., Stoler M.H. and Johns R.A. Am. J. Physiol. 274: L212-L219, 1998.