

# 妊娠動物の胎盤と子宮における NO 産生の意義と NOS 遺伝子発現調節機構

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

滝沢達也, 神作宜男, 田中和明

麻布大学大学院獣医学研究科

Tatsuya TAKIZAWA, Norio KANSAKU and Kazuaki TANAKA

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

**Abstract.** Nitric oxide (NO) production in the rat uterus was quantified by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using an iron complex with N-(dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) as NO trapping reagents. The expression of NOS isoforms was also examined by quantitative RT-PCR analysis. The EPR spectrum of the uterus with Fe-DTCS trapping showed a triplet signal ( $g = 2.038$ ) derived from an NO-Fe-DTCS complex. The EPR signal was diminished in the uterus after NOS inhibitor L-NAME was administered to pregnant rats. The height of the triplet signal obtained from preterm (day 17 of gestation) uterus was significantly higher than that of term uterus (day 21). The level of iNOS mRNA expression in preterm uterus was significantly increased compared to that in term uterus, and significantly higher than that of eNOS mRNA expression in the same uterus. These results suggest that iNOS is the predominant producer of NO in preterm (day 17) uterus and that iNOS-generated NO plays significant roles in the maintenance of pregnancy.

## 1. 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) 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)。

NOは酸化されて亜硝酸塩や硝酸塩になり、これらの尿中への排泄が妊娠期間中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が不安定な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、妊娠期間中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。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試動物および妊娠日齢の算定

Crj: 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NG-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) 法による子宮および胎盤におけるNO産生の解析

妊娠13.5日から妊娠21.5日のラットの背部にFe-DTCS (500 mg/kg as DTCS) を皮下投与し、30分後にエーテル麻酔下で子宮と胎盤を取り出した。組織は細切後、石英のEPR試料管へ充填し、ただちに液体窒素で凍結し、EPR解析に供した。また、NO由来のEPRスペクトルを数値化するために、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の抽出と定量的RT-PCR

妊娠13.5日から妊娠21.5日の無処置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℃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℃にて保存した。

定量的RT-PCRは既報(9)に従い実施した。

## 3. 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NOR1 (同仁化学) から作製した標準サンプルNO-Fe-DTCSのEPRスペクトルを求めると、 $g = 2.038$ のところにTakizawaら(9)の報告と同様な3本の超微細構造よりなるEPRスペクトルが認められた。妊娠17.5日の子宮をEPR解析すると、標準サンプルと同じ $g = 2.038$ の部位に、同様なEPRスペクトルが認められたことより、妊娠17.5日のラット子宮においてNOが産生されていると考えられた。また、サンプリングの前にNOS阻害剤L-NAMEを前投与すると、NO-Fe-DTCS由来のEPRスペクトルは消失し、Cu-dithiocarbamate 錯体由来のEPRスペクトル(7)が観察されたことから、NO-Fe-DTCS由来のEPRスペクトルは子宮のNOS由来と確認された。

次に、同時に測定したMnOのEPRスペクトルを基に、子宮と胎盤におけるNO-Fe-DTCS由来のEPRスペクトルを数値化した。子宮においては、妊娠13.5日から21.5日までNO産生が認められ、妊娠17.5日に産生ピークを示した。また、子宮を脱落膜と子宮筋層に分けてNO産生を解析すると、脱落膜におけるNO産生は子宮筋層のNO産生の約2倍であり、産生パターンも子宮全体のNO産生パターンと良く一致していた。一方、子宮筋層におけるNO産生はどの時期も低値であり、変動幅も小さかった。以上のことから、子宮で産生されているNOはその大半が脱落膜由来と考えられた。

胎盤におけるNO産生も妊娠13.5日から21.5日まで認められ、産生ピークは妊娠15.5日に認められた。

### 2) 定量的RT-PCR

妊娠13.5日から妊娠21.5日の脱落膜において、iNOSmRNAとeNOSmRNAの発現が認められた。iNOSmRNAの発現は、妊娠17.5日にピークを示し、その後漸減した。この産生パターンは脱落膜におけるNO産生パターンと良く一致していた。eNOSmRNAの発現は妊娠13.5日から妊娠19.5日までほぼ一定であり、その後妊娠21.5日に急増していた。

eNOSは細胞内の構成要素であり、刺激因子により細胞内Ca<sup>2+</sup>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17.5日の子宮脱落膜におけるiNOSmRNAの発現がeNOSmRNAの発現よりも多いことから、妊娠17.5日をピークとする子宮脱落膜における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。

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iNOSmRNAの発現が上方制御されることが報告されている(12)。また、妊娠期間中の胎盤や子宮は低酸素状態にあることが知られている。これらの報告を考えると、妊娠期の子宮脱落膜においては、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。妊娠期間を通じた胎盤における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。

#### 4. 要約

妊娠の維持と調節機構に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、子宮と胎盤におけるNO産生の意義とその調節機構を検討した。

#### 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. Update* 4: 3-24, 1998.
- 5) Archer S. *FASEB. J.* 7: 349-360, 1993.
- 6) 吉村哲彦 フェルマシア 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.