

胎盤における一酸化窒素 (NO) 産生と HIF-1 による制御

Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide: possible role of HIF-1 on iNOS expression in rat placenta

滝沢達也, 森田英利, 神作宜男, 田中和明

麻布大学大学院獣医学研究科

Tatsuya Takizawa, Hidetoshi Morita, Norio Kansaku and Kazuaki Tanaka

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The Nitric Oxide (NO) production level was examined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy with Fe-N- (dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) complex as NO-trapping reagent. The expression of NO synthase (NOS) isoform was also examined by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR). In the placenta, NO production level reached a peak on day 15.5 of gestation, and then significantly decreased through the last few days of gestation. The iNOS mRNA expression pattern was in good agreement with the NO production pattern, whereas eNOS mRNA expression showed no marked changes during gestation, suggesting the NO production was mainly regulated by iNOS. In this study, we examined the effect of L-NAME, NOS inhibitor treatment on the level of HIF-1 α mRNA and protein to clarify the hypothesis that HIF-1 α may induce iNOS expression in the mid-term placenta. The level of HIF-1 α protein was significant decreased after L-NAME treatment, and then recovered to the normal level after the end of L-NAME treatment. The level of HIF-1 α protein was in good agreement with the level of NO production, whereas the expression of HIF-1 α mRNA and iNOS mRNA were gradually increased during L-NAME treatment. Present results together with the reports that HIF-1 α has known to combine with HIF-1 β to make HIF-1, its binding to the HRE (hypoxia response element) site on the promoter region of the iNOS gene, suggest that the expression of iNOS gene was induced by HIF-1 via the HRE site, further study should be done to confirm the hypothesis in detail.

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 (O₂) 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。

スピントラップ-EPR法を用いて, 胎盤におけるNO産生を解析すると, ラットにおいては妊娠15.5日にNO産生がピークを示し, その後, 減少すること, このNO産生は主にiNOSにより調節されていることが示されてきた。HIF (Hypoxia inducible factor: 低酸素誘導因子) は, エリスロポエチン遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質として発見され, 低酸素時に分解が抑制されることにより, HIF制御下の種々の遺伝子発現を誘導することが知られている (10)。iNOS遺伝子のプロモーター領域には, 低酸素応答領域 (Hypoxia response element: HRE) が存在し (11), HIFがiNOS遺伝子の発現を促進することが報告されている (12)。そこで, 本研究では, 妊娠中期の胎盤においてピークの認められるiNOSの発現がHIFにより誘導されているとの仮説を立て, その検証を試みた。

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。

3) NOS阻害モデルの作製

妊娠中期の胎盤におけるiNOSの発現がHIF-1により誘導されている可能性を探るため, NOの産生をNOS阻害剤L-NAMEの注入により抑制した後, HIF-1 α とHIF-1 α mRNAの変動を検討した。浸透圧ポン

プを用いて, NOS阻害剤L-NAMEを6, 12, 18または24時間持続注入 (65 μ g/分) し, 妊娠15.5日にサンプリングして, スピントラップ-EPR法によりNO産生量を解析した。同時に定量的RT-PCRにより各種のmRNA発現を解析するとともに, ウエスタンブロット法により, HIF-1 α タンパクを解析した。

4) スピントラップ-EPR (電子常磁性共鳴吸収) 法による胎盤におけるNO産生の解析

妊娠15.5日をサンプリング時とし, 30分前のラット背部に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胎盤を取り出し, 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 (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。

5) 総RNAの抽出と定量的RT-PCR

上記と同様に胎盤を採取し, 液体窒素により急速凍結し, RNA抽出まで-80°Cで保存した。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。定量的RT-PCRは既報 (9) に従い実施した。

6) ウエスタンブロット解析

1次抗体として抗HIF-1 α 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO) を用い, DABにより可視化し定量した。

3. 結果と考察

ラット胎盤における一酸化窒素 (NO) の産生をスピントラップ・EPR法により解析すると, 妊娠15.5日にNO産生量はピークを示し, iNOS mRNAの発現パターンとよく一致することから, この時期のNO産生は主にiNOSにより転写レベルで調節されているものと考えられた。

HIF-1 α mRNAとHIF-1 α タンパクは妊娠13.5日から21.5日まで恒常的に発現しており, HIF-1 α mRNAの発現は妊娠15.5日にゆるやかなピークを示し,

NO 産生および iNOSmRNA の発現と類似していた。

L-NAME を持続注入することにより、妊娠 15.5 日の NO 産生量を減少させると、NO 産生量の減少する時期と一致して HIF-1 α タンパクも減少し、その後、L-NAME の注入を停止した 24 時間後には完全に回復した。また、HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現は、NO 産生が抑制されているときに持続的に増加した。このことは NO 産生と HIF-1 α タンパクが関連していることを示唆している。

iNOS 遺伝子のプロモーター領域には低酸素応答配列 (Hypoxia Response Element: HRE) が存在し、HIF-1 により、iNOS 遺伝子の発現が上方制御されることが知られている。本実験では、L-NAME により NO 産生を抑制すると、HIF-1 α タンパクが減少したことから、HIF-1 α が HIF-1 β と結合して二量体を形成し HIF-1 として iNOS 遺伝子のプロモーター領域の HRE に結合することにより、抽出された HIF-1 α が減少したものと推測された。また、NO 産生が抑制されている時期に HIF-1 α mRNA および iNOSmRNA の発現量が持続的に増加した。HIF-1 α mRNA の発現の増加は HIF-1 α タンパクが減少した結果誘導されたものと考えられ、また、iNOSmRNA の発現の増加は HIF-1 による iNOS の転写促進が起こったためと示唆された。

以上のことから、ラット胎盤における NO 産生がピークを示す妊娠 15.5 日においては、HIF-1 による iNOS 産生調節を介して NO 産生量が制御されている可能性が示唆された。

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、妊娠ラットを用いて、スピントラップ-EPR 法により、妊娠中期にピークを示す胎盤における NO 産生の制御機構を検討した。子宮脱落膜ではステロイドホルモンにより NOS の発現が誘導されるが、胎盤はステロイドホルモンの影響を受けていないことが示唆されていたので、NOS 阻害剤 L-NAME を用いて、一時的に NO 産生を抑制したモデルを作製した。NO 産生の低下とともに HIF-1 α が減少し、一方、HIF-1 α mRNA と iNOSmRNA の発現は徐々に増加していた。この結果は、HIF-1 が iNOS 遺伝子のプロモーター領域の HRE に結合することが報告されていることから、妊娠 15.5 日においては、転写促進により iNOSmRNA の発現が増加し、また、HIF-1 α タンパクが減少した結果、HIF-1 α mRNA 発現が増加したものと考えられた。この時期の胎盤においては、HIF-1 を介して iNOS が転写が促進され、NO 産生量が制御されている可能性が示唆された。

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. Update 4: 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) Semenza GL. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 8: 5: 863-884, 1994.
- 11) Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor LS., Cox GW. and Varesio L. J. Exp. Med. 182: 6: 1683-1693, 1995.
- 12) Palmer LA., Semenza GL., Stoler MH. and Johns RA. Am. J. Physiol. 274: 2 Pt 1: L212-L219, 1998.