慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	網膜におけるNO, CO生成系を介した可溶性クアニル酸シクラーゼの調節
Sub Title	
Author	下山, 勝(Shimoyama, Masaru) 小口, 芳久(Oguchi, Yoshihisa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T185- T198
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0185

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・81(4)：T185〜T198，2004

学位論文

網膜におけるNO，CO生成系を介した可溶性グアニル酸シクラーゼの調節

慶應義塾大学医学部眼科学教室
（指導：小口芳久教授）
下山　勝（しもやま　まさる）

（平成15年12月12日受付）

Key Words：soluble guanylate cyclase, carbon monoxide, nitric oxide, retina

可溶性グアニル酸シクラーゼ（以下sGC）は，血管内皮細胞や神経組織など多くの組織においてcyclic GMP（以下cGMP）依存性のシグナル伝達装置として重要な役割を果たしており生物界に広く分布する酵素である[1〜4]．sGCはα鎖，β鎖二つのサブユニットからなるヘテロダイマーで構成され，一酸化窒素（以下NO）や一酸化炭素（以下CO）などのガス状モノオキシドと結合することによって活性化される．両鎖のC末端側は，共にアデニル酸シクラーゼと相同性が高いアミノ酸配列をもっており，GTPをcGMPに変える触媒部位と考えられている．一方，β鎖のN末端側にはヘム結合部位があり，ガスメディエーターによる酵素活性の調節部位となっている．β鎖のヒスチジン残基（105-His）がヘム鉄の第5配位子と考えられており，sGCは休止状態においては2価のヘム鉄を有している．NOがこのヘム鉄に結合するとヘム鉄を引っぱり上げる効果により対側軸配位子であるヒスチジン残基との結合が切断されシクラーゼ部位が活性化される．COもNOと同様にヘム鉄に結合しsGCを活性化させるが，*in vitro*におけるその効果はNOに比べはるかに弱いとされている[5〜7]．

*in vivo*において，NO依存性のsGC活性化にCOが調節的な役割を果たしているのか否か多くの議論がある．抗血小板薬であるYC-1がCOによるsGC活性化を100倍程度増強させるとの報告があるが，生体内においても未知の内因性低分子リガンドがCOによる酵素活性化においてアロステリック効果を起こしている可能性がある[8]．これまで神経型NO合成酵素（以下nNOS）やCO生成酵素であるヘムオキシゲナーゼ（以下HO）などガス産生酵素が欠損したノックアウトマウスを用いた実験において，COはNOと協調してsGCを活性化することが報告されている[9〜11]．一方，*in vitro*の実験においてCOがNOによるsGC活性化に対して抑制的に働いているという報告もある[12]．このようにCOによるcGMPの調節については不明な点が多く残されている．

神経組織におけるcGMPの生成部位については，その単クローン抗体を用いた免疫組織学的手法により調べた報告がある[13, 14]．しかし，cGMPの局在はsGCによる調節のみならずNOやCOの調節を受けない膜結合型のグアニル酸シクラーゼ（以下pGC）やホスホジエステラーゼ（以下PDE）の働きによっても影響を受けている．このように生体内におけるNOやCOなどのガス生成系を介したsGCの調節機構は，その臓器内局在や*in vivo*における酵素自身へのアロステリック効果の有無に関して未解決な問題が多く残されている．

本研究では，ラット網膜組織を用いてsGCの局在を免疫組織学的に調べるとともに，*in vivo*においてガス生成系に影響を与える薬剤を用いてその生成系を調節し，sGCの活性化に伴う構造変化を認識できるモノクローナル抗体を用いて網膜組織でのNO，COによるsGCの活性化状態を調べた．内因性ガスによるsGC活性化機構において，COとNOの相互作用を調べることを目的とした．

この論文はKajimura M, Shimoyama M, et al：Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina. The FASEB Journal express article 2003；10.1096/fj.02-0359fje. published onlineの一部を含む．

対象および方法

1．動物および網膜組織採取方法

以下の実験動物の取り扱いは，慶應義塾大学医学部の動物実験ガイドラインに従った．雄の Sprague-Dawley rats（体重 280～350 g，埼玉実験動物供給所）に sodium pentobarbital (50 mg/kg) を腹膜下注射し麻酔を行った．灌流固定するために胸腔を開き，右心房を切開した後に左心室に 18G 針を刺入し，リン酸緩衝液（以下 PBS）を注入して血液を洗い流し，4％パラホルムアルデヒドを用いて 10 分間灌流固定を行った．眼球組織切片作成時のオリエンテーションのために眼球摘出時に絹糸にて眼球背側部にマーキングを行った．摘出した眼球は角膜輪部後方にて切開し，角膜・水晶体を含む前部と，強膜・網膜を含む後部組織とに 2 分割した．分離した後部組織に含まれる硝子体をセッシにて注意深く除去した後，網膜組織を氷上にてさらに 1 時間，4％パラホルムアルデヒド固定を行った．固定後，6％，12％，18％，24％，30％ショ糖溶液に段階的に浸しクライオプロテクションを行い，OCT compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN) で包埋した．クライオスタットにて耳側―鼻側の方向で視神経を含むように厚さ 12 μm の網膜切片を作成した．

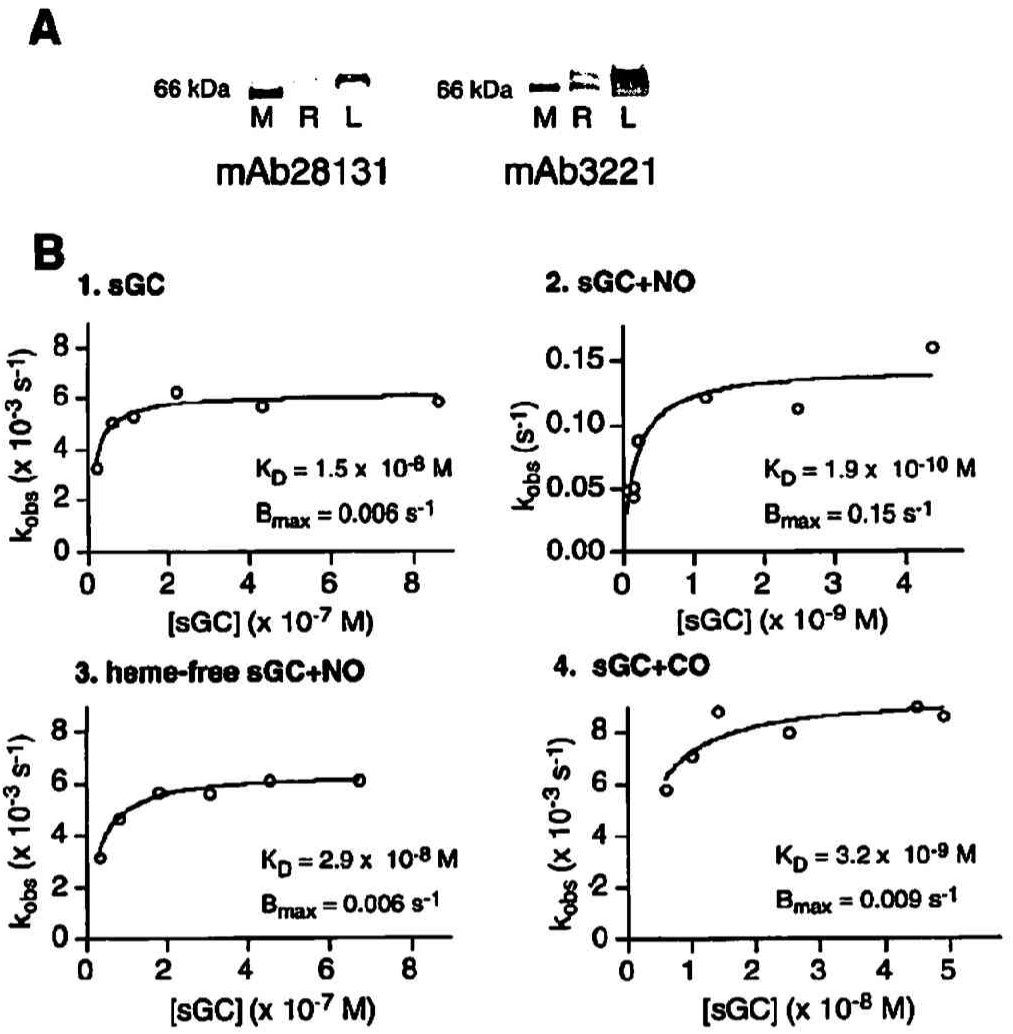
2．抗 sGC 抗体の特徴と免疫染色方法

抗 sGC 抗体は，Tsuyama らの報告した抗ウシ sGC モノクローナル抗体 mAb28131 と mAb3221 を用いた[15]．これらの抗体と精製 sGC との親和性を，resonant mirror biosensor (IAsys, Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge, UK) を用いて調べた．速度定数（K_{obs}）はコンピュータープログラム（Fast Fit, Fisons）により求めた．解離定数と最高結合分子数をそれぞれ K_d，B_{max} で表すと，速度定数 K_{obs} と sGC 濃度 [sGC] の関係は $K_{obs}=B_{max}$ [sGC]/(K_d+[sGC]) で表すことができる．この二つの係数 K_d と B_{max} は，interacting curve fitting program (Igor Pro 3.12, WaveMetrics, Oregon) により求めた．これらのシステムを用いて，NO および CO 存在下におけるモノクローナル抗体と sGC の親和性の変化を調べた．酵素活性における補欠分子ヘムの関与を調べるために必要に応じてウシ sGC からヘムを除去した．NO または CO 溶解液は過去の報告に基づいて作成した[16]．NO 溶解液は NO を窒素飽和 PBS 溶液中でバブリングして溶解し，必要な濃度に希釈した．過去の報告[15]や後述の第 1 図で示すように，mAb3221 は NO の作用により sGC に対する親和性が増加したが，mAb28131 ではこの変化はみられなかった．

網膜組織における sGC 活性の変化をみるために，これらのモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った．凍結切片を 2％正常ウマ血清/PBS 中で 30 分間インキュベートした後に，mAb28131，mAb3221 をそれぞれ 50 μg/ml，30 μg/ml の濃度で反応させた．これらの抗体は 1％ウシ血清アルブミン，0.1％ TritonX-100 を含む PBS（以下 PBST）で溶解し 4℃で一晩反応させた．これらの 1 次抗体を洗浄後，切片は 2 次抗体 biotinylated anti-mouse Ig-G (Vecstain Elite ABC kit；Vector Laboratories Inc.) で 30 分間，室温にてインキュベートした．内因性ペルオキシダーゼ活性は 0.3％H_2O_2 処理にてブロックした．洗浄後，abidin-biotin HRP で 30 分間インキュベートし，3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.2mg/ml) にて発色を行った．sGC の免疫染色における発色時間については 11 分間に固定した．ネガティブコントロールとしては非特異的マウス免疫グロブリン（nonimmune mouse IgG）を使用した．発色後，20％ホルマリン/PBS で 20 分間再固定し，PBS で洗浄後，4％メチルグリーン（E.Merck, Darmstadt, Germany）にて核染色を行った．

網膜におけるガス生成系酵素の発現についても同様に免疫染色を行った．CO 生成系酵素である HO については，抗ラット HO-1，HO-2 モノクローナル抗体である GTS-1，GTS-2 をそれぞれ使用した[17, 18]．抗 nNOS 抗体および抗内皮型 NOS（以下 eNOS）抗体は，それぞれ抗ラット nNOS，eNOS モノクローナル抗体（Transduction Laboratories, Lexington, KY）を使用した．さらに，ビリルビン IXα（以下 BRIXα）を認識する抗体として，モノクローナル抗体 24G7 を使用した[19, 20]．BRIXα は，HO の特異的な分解産物であるビリベルジン IXα がビリベルジン還元酵素により還元されたものである．24G7 抗体陽性反応を，生体内において HO によるヘム分解と CO 生成が行われていたことの傍証とした[18]．

ラット網膜組織から蛋白サンプルを集め，これらモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った．HO は小胞体に存在するため HO-1，HO-2 に対してはミクロソーム分画を，sGC については可溶性分画を電気泳動用に用意した．脾臓と精巣から用意したミクロソーム分画はそれぞれ HO-1，HO-2 のポジティブコントロールとして使用した．sGC のポジティブコントロールとしては肺組織の可溶性分画を用いた．



第1図　抗ウシsGC抗体の特徴．A：ラット網膜の可溶性分画とsGCモノクローナル抗体mAb28131，mAb3221との反応．mAb28131とmAb3221の双方とも免疫反応が認められる．mAb28131では76kDaに有意なバンドを認める．mAb3221においては更にsGCのα鎖に相当する66-68kDaにもバンドを認める．M：分子量マーカー，R：網膜，L：肺．B：IASys resonant mirror biosensorによるmAb3221とsGCの結合定数の決定．sGCのそれぞれの濃度における速度定数K_{obs}をFast Fitプログラムを用いて調べた．sGC濃度に対するK_{obs}の結合曲線は次の式に適合させた．$K_{obs}=B_{max}$ [sGC]/(K_d+ [sGC])．B_{max}とK_dの二つの係数はinteracting fitting programにより求めた．（1）sGCとmAb3221との相互作用．（2）NO存在下でのsGCとmAb3221との相互作用．（3）NO存在下におけるヘムフリーsGCとmAb3221との相互作用．（4）CO存在下でのsGCとmAb3221との相互作用．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第1図を，許可を得て転載）

3．レーザー共焦点顕微鏡によるsGC発現細胞の同定

sGCとHOの発現細胞を同定するためにレーザー共焦点顕微鏡を用いて免疫二重染色を行った．抗体として抗ヒトcarbonic anhydrase II抗体（以下CAII抗体），CAH-II (1：1000；Serotec Ltd., Oxford, UK) と抗ウシprotein kinase C（以下PKC）α抗体，MC5 (1 μg/ml；Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) をPBSTで溶解し，4℃で一晩網膜切片と反応させた．抗CAII抗体と抗PKCα抗体はそれぞれミュラー細胞とオン型双極細胞のマーカーとして知られている[13, 21~23]．

PBSTとPBSにて数回洗浄の後，室温にて60分間二次抗体を作用させた．二次抗体は，CAIIに対してはフィコエリスリン（以下PE）で標識したロバ抗ヒツジIgG抗体（1：400；Chemicon International, Inc., Temecula, CA）を，PKCαに対してはPE標識ヤギ抗マウスIgG抗体（1：400；Leinco Technologies, Inc., Ballwin, MO）を用いた．二重染色用にsGC抗体（mAb28131）をフルオレセインイソチアネート（以下FITC）で標識した（50 μg/ml；持田蛋白精製工業，群馬）．Nicon Diaphot 300倒位型蛍光顕微鏡（油浸対物レンズ；開口数1.4, 60×Nicon PlanApo oil）にアルゴンレーザー（Omnichrome, Carlsbad, CA）を用いたレーザー共焦点システム，line-scan laser confocal imager (Insight/TMD300；Meridian Instruments., Inc., Okemos, MI) を取り付け，切片の共焦点画像を観察した．励起波長488 nmのアルゴンレーザー光落射下にintensified charge-coupled device color video camera (C5810；浜松ホトニクス，浜松）を通してFITCとPEを同時に可視化して観察した[17, 24]．

4．In vivo網膜におけるNO，CO生成系への薬剤刺激

In vivoにおけるsGC活性の変化を免疫組織学的に捕らえるため，NOやCO生成に影響を及ぼす薬剤を投与し，mAb28131とmAb3221による染色性の変化を観察した．麻酔下でラットの大腿静脈にカテーテルを挿入し，滅菌PBSで希釈した薬剤を1 ml，約60秒かけて投与した．コントロール群のラットには同様の方法で基剤を投与した．薬剤投与後に胸腔を開き心臓から灌流固定を行った．薬剤は，L-およびD-アルギニン70 μmol/kg body wt.，N^{ω}-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル（以下L-NAME）85 μmol/kg body wt.を用いた．L-アルギニンはNO合成酵素の基質であり，L-NAMEはその競合阻害剤である．HOに対する競合阻害剤として亜鉛プロトポルフィリンIX（以下ZnPP）を，阻害効果をもたない銅プロトポルフィリンIX（以下CuPP）をコントロールとして使用した[18]．これらの使用濃度は86 nmol/kg body wt.とした．

5．網膜組織におけるsGC免疫組織活性の半定量的解析

薬剤投与群の各グループ間におけるmAb28131とmAb3221の免疫反応の違いを形態学的に解析するため，網膜の連続切片を用意し，それぞれの抗体を作用させた後avidin-biotin HRP反応を用いて染色し半定量的解析を行った．1つの切片において3つの視野（幅325 μm）を写真に記録した．3つの観察視野は，視神経乳頭から上方，下方それぞれ200 μm離れた部位と，上方600 μm離れた部位である．3つの切片から合計9視野をエクリプスE600顕微鏡（Nicon, 40×Nicon Plan Fluor対物レンズ，開口数0.75）を用いてNicon FDX-35カメラで撮影した．視野絞りは0.6とし，露出時間はNicon U-III Multi-point sensor systemによりコントロールした．

網膜細胞層におけるsGC活性の部位特異的変化を評価するために二つのプロトコールを施行した．最初にmAb28131とmAb3221の顕微鏡写真をデジタル化してコンピューターに取り込み（Image 1.62/Macintosh G3, Sankei Inc., 東京），染色性の強さを256段階のグレイスケールに換算した．それぞれの画像において，神経線維層（optic-fiber layer，以下OpFL），内網状層（inner plexiform layer，以下IPL）そして外境界膜（external limiting membrane，以下ELM）の3ヶ所でグレイレベルを測定した．これらの層ではメチルグリーンで染色された核が存在しないため，取り込んで換算されたグレイレベルはsGCの免疫反応を反映しているものと考えられた．さらに，神経線維層の内側はミュラー細胞の足突起と神経線維を含んでいるが，双極細胞の神経突起は含んでいない．これに対して内顆粒層はミュラー細胞や双極細胞の細胞体を含んでいる．このように，それぞれの層における染色性の変化を比較することにより，どの細胞がsGC活性化に関与しているかを調べた．組織の存在しない部位をグレイレベルの背景（G_{BG}）とした．それぞれの層において少なくとも20ヶ所の異なる部位の値からグレイレベルの平均値を求めた．測定した値からこのG_{BG}を差し引くことにより部位特異的な免疫反応の強さを決定した．OpFL，IPLそしてELMの3層でそれぞれG_{OpFL}，G_{IPL}，G_{ELM}を求めた．4～8回の別々の実験から得られたG_{OpFL}，G_{IPL}，G_{ELM}の平均値をそれぞれ比較した．

次に，内顆粒層（inner nuclear layer，以下INL）においてはメチルグリーンによる核染色のためグレイレベルを用いた染色性強度の解析はできず，sGC陽性細胞密度の違いをグループ間で比較することにした．この層には，双極細胞，アマクリン細胞，ミュラー細胞など幾つかの異なった種類の細胞体が存在している．細胞体全周の4分の3以上がリング状に染色されている細胞を陽性細胞としてカウントした．それぞれのサンプルにおいて幅150 μmの異なった18ヶ所の領域を選び陽性細胞数の平均値を求めた．解剖学的な部位による差が生じ

ないように，切片は常に耳側－鼻側を含む面で視神経乳頭が中心にくるように作成した．INL の厚さの平均は 33±2 μm で，この研究に用いた眼球はどれもほぼ同じサイズの大きさであった．これらのことから INL に存在する総細胞数がグループ間で似通っていて，細胞の割合も似ていると考えられた．よって内顆粒層の総細胞数は求めずに陽性細胞数をカウントすることにより免疫反応の強さを比較検討することにした．

6．sGC 活性化に対する CO と NO の相互作用

NO による sGC 活性化に対する CO の影響を調べるため，ウシ肺から精製した sGC を用いて産生された cGMP を enzyme-linked immunosorbent assay (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて測定した[16]．反応液は，5 mM $MgCl_2$，3mM dithiothreitol，1 mM 3-isobuthyl-1-methylxanthine，1 mM GTP，2.5 nM sGC を含む 40 mM TEA-HCL buffer (pH7.4) を用いた．酵素は 37℃で 10 分間反応させ，30%の酢酸を総量 1 ml になるように加えて反応を止めた．NO 供与体として S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン（以下 SNAP），(Inter Medical，東京）を用い，pH7.4 の PBS で実験 30 分前に調整した．濃度を調整した CO 溶液は過去の報告に基づいて作成し酵素反応に対する効果を調べた[16, 25]．

7．統計処理

測定値から平均値±標準偏差を求め，群間の分散検定を ANOVA を用いて解析し，平均値の差の検定を Fisher's multiple comparison test を用いて行った．$P<0.05$ をもって統計学的有意差とした．

結　果

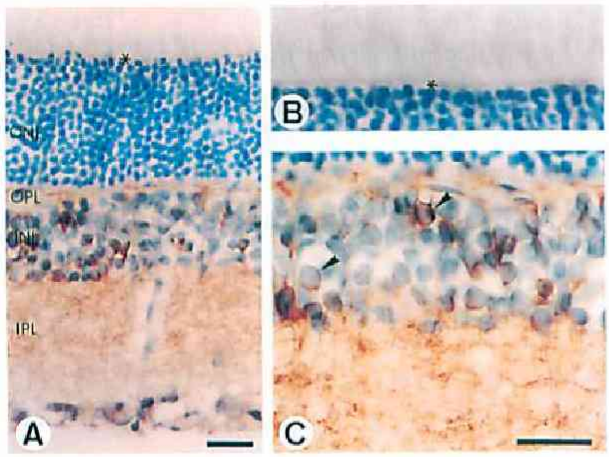
1．mAb3221 の sGC に対する親和性の検討

第 1 図に抗ウシ sGC 抗体 mAb3221 と mAb28131 の特徴を示した．Panel A のごとくウェスタンブロット解析で，両抗体はラット網膜組織に免疫陽性反応を示すが，両者は違ったパターンを示している．mAb28131 は 76kDa に主要なバンドを 1 つ示している．これは sGC の β 鎖に対する反応を示している．これに対し，mAb3221 は 76kDa の他に 66-68kDa と 2 つの陽性バンドを認める．これは，サンプルの蛋白質を調整した後でも α 鎖と β 鎖の両方に反応することを示している[15]．ペプチドマッピング解析の結果，mAb3221 の認識に関与するエピトープは，α 鎖の S361-K368 (SSRVMDLK) と β 鎖の G128-K151 (GKGLILHYYSEREGLODIVIGIIK) であった[15]．

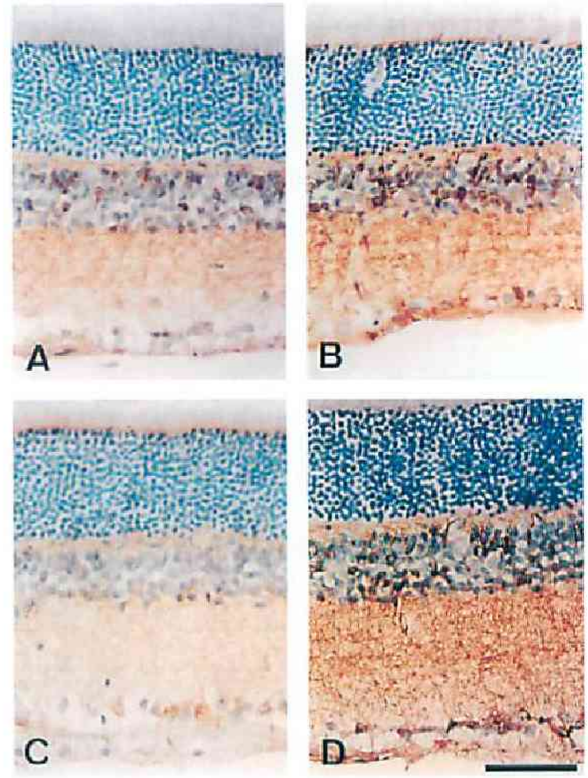
以上のことから mAb3221 は sGC 蛋白の二つのサブユニットによって決定される特異的な蛋白構造を認識している可能性が示唆された．sGC 酵素と mAb3221 との反応を定量化するため，精製した sGC と固相化した mAb3221 を用いてバイオセンサーテクノロジーを用いて解析した．第 1 図の Panel B は，0.05-860 nM の sGC 濃度に対する結合分子数 K_{obs} を示している．解離定数 K_d と最大結合値 B_{max} は NO も CO も存在しないコントロール状態では，K_d は 1.5×10^{-8}M，B_{max} は 0.006s^{-1} であった（Part 1）．充分な NO 存在下では B_{max} は 0.15 s^{-1} と著明に上昇し，K_d 値は 1.9×10^{-10}M と 2 桁減少した（Part 2）．このことは mAb3221 の sGC に対する親和性は，NO 存在下にて増大することを示している．ヘムを除去した sGC においては NO による明らかな結合能上昇は認められなかった（Part 3）．このことは NO による抗体の結合能増加が，sGC の補欠分子であるヘムと NO との反応に伴うコンフォーメーション変化を反映していることを示している．CO の添加にても sGC に対する mAb の親和性が増したが，K_d は 3.2×10^{-9}M，B_{max} は 0.009 s^{-1} であり，その強さは NO に比して弱かった．これらの結果は，NO と CO とでは構造変化を引き起こす強さに違いはあるが，これらガスモノオキシドがヘムに結合することによって活性化した時の sGC の蛋白構造変化を伴うエピトープを mAb3221 が認識していることを示唆している．ZnPP や CuPP そのものが結合能に与える変化についても調べたが，これらによって解離定数の変化は認められなかった．一方 mAb28131 においては，これらのガス分子による親和性の変化を認めなかった[15]．

2．網膜における sGC 発現細胞の同定

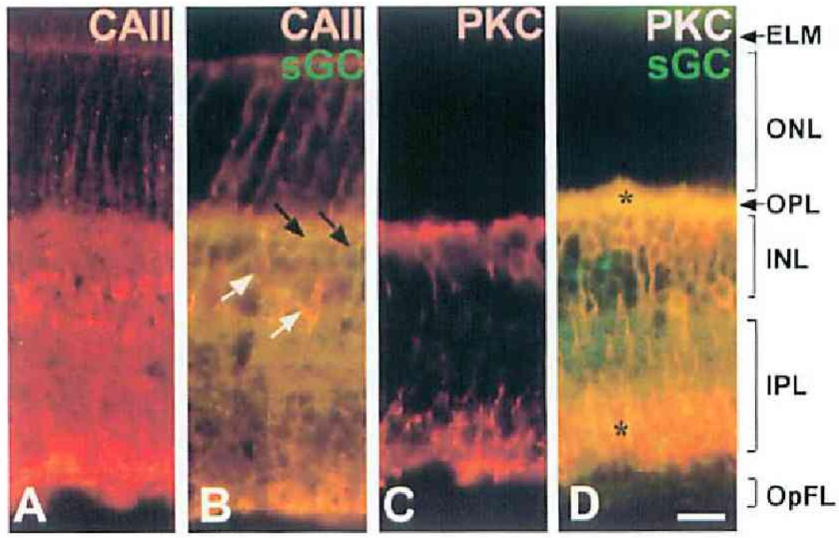
第 2 図は，β 鎖のみを認識する mAb28131 抗体を用いた染色により sGC の分布を示したものである．陽性細胞は ELM から OpFL までの幾つかの層にまたがって認められる（Panel A）．これに対し視細胞の細胞体の存在する外顆粒層（outer nuclear layer，以下 ONL）にはほとんど反応が見られなかった．Panel B にみられるようにミュラー細胞の微絨毛が視細胞内節と接着帯を形成している ELM 部位に免疫反応陽性を示した．INL には細胞体が取り囲まれるように強陽性に染色される細胞を認めた．経静脈的に過剰な L-NAME を投与した場合においても，mAb28131 の染色性の変化は認められなかった．



第2図　ラット網膜におけるsGC免疫染色．A：mAb28131抗体による染色．外網状層（OPL），内顆粒層（INL），内網状層（IPL）に陽性所見を認める．ONL：外顆粒層．B：外境界膜（ELM）の強拡大所見．C：OPL，INL，IPLにおける強拡大所見．INLにおいて細胞体を囲むように強陽性の細胞体が認められる（矢印）．＊：ELM．スケールバーはA，B，Cともに20 μm．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第2図を，許可を得て転載）



第4図　NOおよびCO産生系を変化させた時のsGCの染色性変化．mAb3221による染色．A：基剤を用いたコントロール．B：L-アルギニン投与．OPL，INL，IPL，ELMにおいて染色性が増している．C：L-NAME投与．OPL，INL,IPLにおいて染色性の減弱がみられる．D：ZnPP投与．L-アルギニン投与の時と同様に染色性の増強がみられる．スケールバーは20 μm．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第4図を，許可を得て転載）



第3図　ラット網膜におけるsGCの局在．A：carbonic anhydrase II（CAII）による染色．ELMからOpFLにまでCAIIの染色性が見られる．B：CAII（赤）とsGC（緑）の二重染色．両者が共に存在する細胞ではオレンジ色～黄色に染色されている（白矢印）．CAIIが存在しないsGC陽性細胞は緑色の細胞として観察される（黒矢印）．C：PKCαによる染色．オン型双極細胞が赤く染色され，神経節細胞層の近くの分葉状終末から外網状層OPLまで突起を伸ばしている．D：PKCαとsGCとの二重染色．外網状層にある幾つかの双極細胞の細胞体が両者に染色され黄色を呈している．スケールバーは20 μm．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第3図を，許可を得て転載）

網膜に存在する細胞を特異的に染色するマーカーとmAb28131抗体との二重染色を行うことにより，どの細胞がsGC発現に関与しているか調べた．第3図のPanel Aにミュラー細胞の特異的マーカーであるCAIIの染色性を示した．解剖学的にミュラー細胞の分布と一致してOpFLからELMまで染色されているのが確認された．Panel BにsGCとCAIIの染色をそれぞれ緑と赤で二重染色したものを示した．多くの細胞が，sGCとCAIIの両者に反応し，ミュラー細胞の突起がオレンジ色の発色を呈している．しかしながら，INLに小さいがいくつもの細胞が緑色に染色されている．これはミュラー細胞以外にもsGC陽性細胞が存在することを示している．それらの細胞を特定するために，オン型双極細胞のマーカーであるPKCα抗体を用いてmAb28131との二重染色を試みた．第3図のPanel Cに示すように，PKCαの染色性はオン型双極細胞の解剖学的局在と一致して神経節細胞に接する小葉状の終末から視細胞とのシナプスを形成する外網状層（outer plexiform layer，以下OPL）にまでの細胞が染色されていた．Panel DにsGCとPKCαの二重染色を示す．幾つかの細胞がsGCとPKCαとに二重染色されるが，はっきりと緑色に単染色されている細胞はIPL，INLからOpFLまで分布しており，Panel Bのごとくミュラー細胞の発現を示していると思われた．以上のことから，ラット網膜における主要なsGC発現細胞は，ミュラー細胞とオン型双極細胞とであることが確認された．

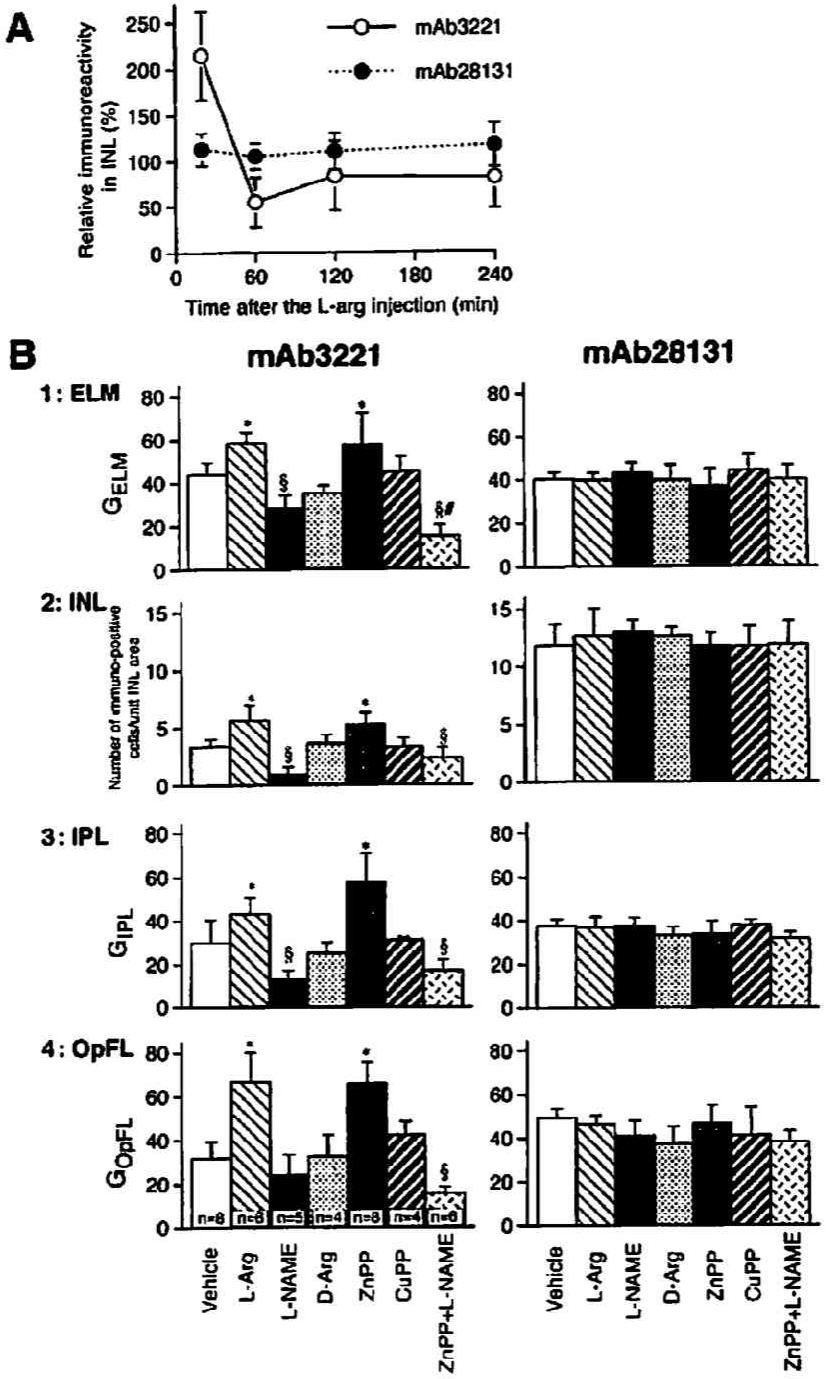
3．mAb3221抗体を用いた網膜sGC活性化の識別

第1図に示したようにmAb3221はsGCの活性化による蛋白構造変化を認識することができる．様々な条件下で生体内のsGC活性を変化させ，網膜切片をmAb3221で免疫染色することによりsGC活性化の状態を視覚化した．第4図のPanel Aの定常状態におけるsGCの染色性は，Panel Bに示すようにL-アルギニンを投与することによって増強が見られた．この増強は，網膜のOPL，INL，IPLなど幾つかの層において認められた．L-NAMEによって内因性のNO産生を抑制すると，今度は全ての細胞層において染色性の減少が認められた．(Panel C)．mAb28131による染色性はこれらの薬剤によって変化しなかった．ラット網膜組織におけるこのようなmAb3221による染色性の変化は，この抗体がガスによるsGC活性の変化を識別できることを示している．興味深いことに，Panel Dに示すようにHO阻害剤であるZnPP投与により内因性のCO産生を抑制するとmAb3221の染色性が著明に増加することが確認された．またこのような染色性の変化はアセトン固定，ホルマリン固定を施した標本では検出できないため，ここに示した固定法であればsGCの活性を反映した変化をひろえるものと判断した．

mAb3221の免疫反応の形態学的解析に移る前に，L-アルギニン投与から組織固定までの時間が染色強度に影響するか調べた．第5図のPanel AにL-アルギニン投与後固定までの時間を横軸に，INLにおけるmAb3221陽性細胞数の増加率を縦軸にプロットした．細胞密度はL-アルギニン投与20分後に最大になった．このL-アルギニン投与による陽性細胞数の増加はmAb28131による染色，またはD-アルギニンに投与では認められなかった．これらのことから二つのsGC抗体の染色性の変化を比較することによって，sGC活性化の状態を調べることが組織標本上でも可能と考えられた．

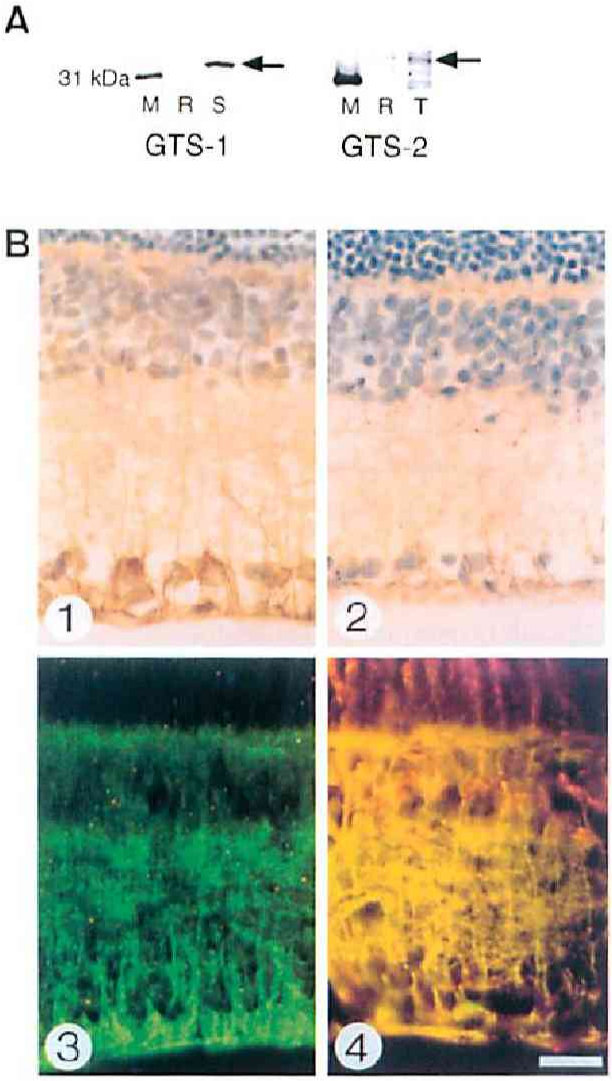
網膜組織において内因性に産生されているNOおよびCOが，部位特異的にsGC活性を調節しているかについて調べた．INLのmAb3221陽性細胞数を解析するのに加えて，ELM，IPL，OpFLの3つの異なる部位においてグレイレベルを解析し，それぞれG_{ELM}，G_{IPL}，G_{OpFL}として数値化した．第5図のPanel Bに網膜の各層におけるmAb3221およびmAb28131の染色性の違いを示した．網膜組織の4つの部位におけるmAb3221の染色性変化のパターンはどれも似た傾向を示していた．例えば，Panel B-1のようにELM上の部位において，mAb3221の染色性は，L-アルギニンによって増強されるが，D-アルギニンによっては増強が見られていない．これに対し，L-NAME投与によって内因性のNOを抑制すると染色性の強度は減少した．さらにHO阻害剤のZnPP投与によって内因性CO産生を抑制すると，mAb3221の染色性は著明な増強がみられた．この変化はHO阻害作用のないCuPP投与群では認められなかった．ZnPP投与による染色性増強がNOを介した反応であるか否か調べるためにHO阻害剤とL-NAMEとを両方同時に投与した．ZnPP単独投与の時に認められた染色性の増強は，NO産生を阻害することにより打ち消された．

興味深いことにZnPPによるmAb3221染色性増強がL-NAMEによって抑制されたが，その効果は網膜の層によって明らかな違いがみられた．4つの部位のうちL-NAME単独の時に比較して，ZnPPとL-NAMEの同時投与の方がmAb3221染色性を顕著に減少させた部位は，ELMであった．同様に，統計学的な有意差は認めなかったが（$p=0.09$），OpFLにおいても同様の減弱が認められた．このことは網膜上の特異的な部位に



第5図　ラット網膜の各層におけるsGC免疫染色の半定量的解析．A：縦軸には，INLにおけるmAb28131とmAb3221の染色性の変化を，基剤コントロール群の染色性に対する割合として示した．L-アルギニン投与20分後にmAb3221の染色性は最大となった．B：縦軸に染色性の強さをグレイレベルで示した．INLにおいては陽性細胞数を示した．L-argとZnPP投与によってmAb3221抗体の染色性は著しく増加しているが，L-NAME投与では減少がみられる．L-NAMEとZnPPとを同時に投与するとZnPP単独投与の時にみられたmAb3221の増強は認められなかった．これらmAb3221においてみられた染色性の変化はmAb28131においては認められなかった．＊$p<0.05$；コントロールに対する増加．•：基剤投与と比べた減少．§：L-NAME単独と比べた減少．網膜における各部位は左に表示した．平均値±SD．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第5図を，許可を得て転載）

おいては，NO の非存在下でも基礎的な sGC 活性化の維持において CO がその役割を担っていることを示唆している．これに対し，INL および IPL においては両薬剤同時投与群は，L-NAME 単独で処理した群と比較しても有意差を認めず，これらの部位においては基礎的レベルにおける sGC 活性化は主に NO 依存的に行われていると考えられた．一方，これらの結果に対し mAb28131 抗体による染色では，同様の薬剤投与によってグレイレベルに変化は認められなかった．

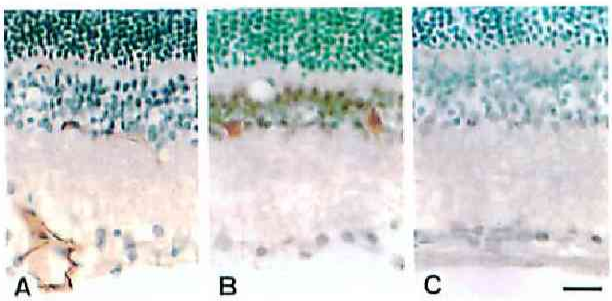


第 6 図　A：ラット網膜ミクロソーム分画のウェスタンブロット解析．左に抗 HO-1 モノクローナル抗体，GTS-1，右に抗 HO-2 モノクローナル抗体，GTS-2 の反応を示す．脾臓（S）において HO-1 を示す 32kDa に有意なバンドを認めるが，網膜（R）においては認められていない．一方，36kDa バンドは網膜（R）および精巣（T）の双方において認められる．M：分子量マーカー．B：ラット網膜における CO 産生酵素，GTS-2 による HO-2 単染色像（1），抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 染色像（2），GTS-2 による蛍光単染色像（3），CAII と GTS-2 の蛍光二重染色像（4）．スケールバーは 20 μm．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第 7 図を，許可を得て転載）

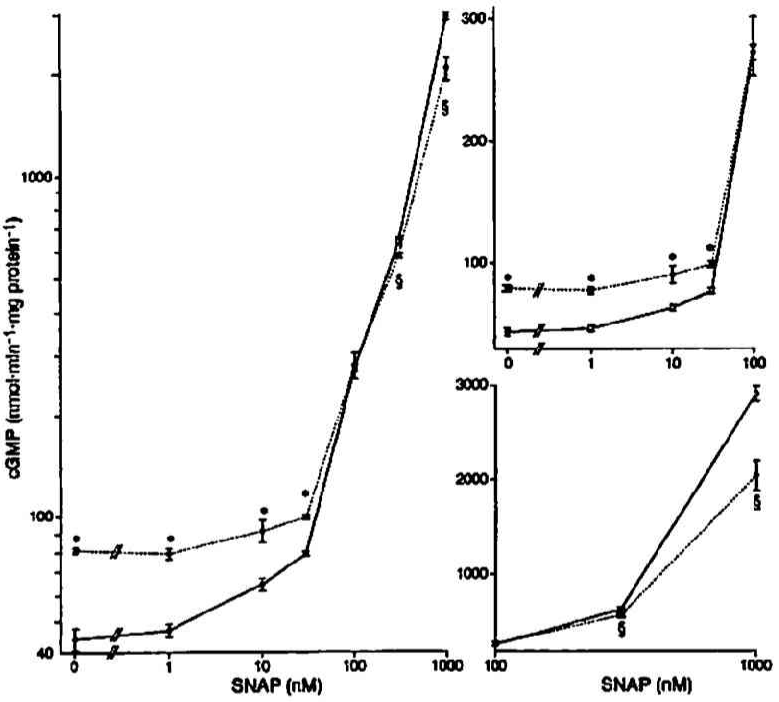
4．網膜におけるガスモノオキシド産生部位の免疫組織学的検討

ZnPP による内因性 CO の抑制が sGC の活性化を引き起こすことから，どの細胞が CO 産生に関与しているかを調べた．ウェスタンブロット解析（第 6 図，Panel A）にみられるように，抗ラット HO-1 抗体，GTS1 は網膜組織ライゼートに検出可能な反応を示さなかったのに対し，抗ラット HO-2 抗体，GTS2 は 36kDa において反応がみられた．このことは網膜組織においては HO の主要なアイソザイムは HO-2 であることを示している．CO 産生系を探るために GTS-2 による免疫染色を行った．第 6 図の Panel B，Part 1 に示すように，OpFL から伸びた突起が ELM まで及んでおり，解剖学的にミュラー細胞の染色性を示している．抗ビリルビン IXα モノクローナル抗体，24G7 で染色した時にも同様の染色パターンが認められた．このことは HO によるヘムの分解とそれに続く CO の産生がこの部位において行われていることを示している．次に，二重染色することによりどの細胞が HO-2 陽性細胞かを調べた．CAII と HO-2 の二重染色において，共に陽性の細胞が確認され，HO-2 陽性細胞の多くはミュラー細胞であることが判明した．これらのことからミュラー細胞はプロトヘムを CO に分解する HO-2 発現の主要な細胞であることが確認された．

第 7 図にラット網膜における NO 産生系についての染色結果を示す．抗 eNOS 抗体では硝子体腔寄りの比



第 7 図　ラット網膜における NO 産生細胞の分布．eNOS（A），nNOS（B），mouse IgG（C）．スケールバーは 20 μm．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第 8 図を，許可を得て転載）



第8図　*in vitro* における sGC に対する CO の効果．SNAP 投与により濃度依存的に sGC が活性化された．反応液に CO がある場合を黒丸で，ない場合を白丸で示した．データは3回の実験の平均値示した．（Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第9図を，許可を得て転載）

較的大きな血管内皮細胞に強い染色性が認められた．IPL と INL の血管内皮も染色が確認されたが，その頻度は多くはなかった．ONL，ELM は染色されなかった（Panel A）．これに対し，nNOS 抗体においては，INL の低い部位に染色されている細胞が所々認められたが（Panel B），これは解剖学的特徴からアマクリン細胞と思われた．他の細胞にはほとんど染色性を示さなかった．これらの結果は，過去の報告とも一致しており[26, 27]，OpFL，IPL，INL などの部位と比べて ELM がもっとも NO 産生部位から解剖学的に遠位に位置していることが確認された．

5．In vitro における sGC 活性化に対する CO と NO の相互作用の検討

上述の結果から NO による sGC 活性化に CO が干渉しているか，*in vitro* の実験を組んで確認した．第8図に示すように，精製したウシ sGC を SNAP により活性化させ，産生された cGMP 量を縦軸にプロットすると，30 μM の CO 存在によりベースラインより約2倍の sGC 活性化を示した．100nM 以下の濃度の SNAP であれば CO は sGC を軽度活性化していた．これに対し，SNAP が大量に存在した時には，CO は sGC の過剰な活性化を減弱させる効果を示した．第8図の右側にリニアスケールにてプロットし直すと，CO は基礎的レベルの sGC 活性化を 250%増加させ，1 μM SNAP によって酵素が活性化された場合は約 40%の抑制効果を示した．CO 濃度を 10 μM に変えた実験でも同様の効果が認められた．

考　察

今回の研究において，sGC がミュラー細胞およびオン型双極細胞に存在することをモノクローナル抗体を用いて証明した．これは過去の報告における sGC の mRNA の発現分布とも一致している[28]．さらに本研究は，sGC 活性が内因性の NO および CO によってコントロールされていることを免疫学組織学的手法を用いて示した初めての報告である．また，これらのガスによる

sGC 活性調節は網膜上で一様に行われるのではなく，異なった細胞層で部位特異的に行われていることも示された．定常状態で産生されている CO 濃度を ZnPP 投与により抑制すると，全ての網膜細胞層において NO 依存性の sGC 活性化の増強が認められた．これに対し，OpFL，ELM においては，NO 抑制状態でさらに内因性の CO 産生を抑制すると，sGC 活性は NO 単独抑制よりさらに強い抑制作用がみられた．即ち網膜の特定部位において CO はそれ自身が sGC を活性化させているだけではなく，別の部位においては NO による sGC 活性化を抑制する働きをもち，CO が sGC 活性を微調整している可能性が示された．

今回の研究において，内因性ガスモノオキシド産生を調節することによって，sGC 活性が網膜の層によって不均一に制御されていることが示された．このことは，*in vivo* における局所 sGC の活性化が NO のみならず CO による調節も受けていることを示唆している．ミュラー細胞に的を絞って述べると，定常状態における sGC は層特異的に調節を受けていると考察できる．網膜の縦軸方向における酸素分圧勾配の存在を考慮に入れると[29]，本研究で局所の NO，CO 濃度のバランスにより，なぜ sGC 活性化の程度が不均一になったのかを考察することが可能となる．即ち，HO-2 や BRIXα の免疫染色にみられるように，ミュラー細胞は網膜のどの層においても CO を産生していることが分かる．これに対し，NO 濃度はその産生細胞の存在部位，拡散速度および半減期などを考慮すると[30]，各細胞層によって異なっていると推察される．いくつかの要因を考慮すると，IPL と INL は OpFL および ELM よりも NO 濃度が高いと考えられる．まず，毛細血管に発現している eNOS やアマクリン細胞に発現している nNOS のなど網膜における NO 産生系が，IPL や INL においては ELM と異なり解剖学的にすぐ近傍に存在していることが分かる．次に，OpFL は他に比べ眼底血管から比較的十分な酸素を享受できると考えられ，そのような環境が，この層において血管内皮が eNOS を豊富に発現しているにもかかわらず NO の生理学的活性を低めに維持していると考えられる[30]．3 番目に，ELM は前述の様に NO 産生細胞とは解剖学的に遠隔にあり，この部位においては HO-2 と BRIXα が陽性所見を示していることより HO-2 を介して局所的なヘム分解を構成的に行っていると思われる．言い換えればこの層においては，CO に比して NO の生理学的な影響力は INL や IPL よりも低いものと考えられる．

網膜組織における sGC 活性が不均一な反応を示したメカニズムを解明する上で，*in vitro* の実験において NO 依存性の sGC 活性化に対し CO が抑制効果を示したことは，生理学的に重要な意義を有している．例えば，OpFL や ELM のように局所的に NO 濃度が低い部位においては，CO は sGC を軽度に活性化しているため，L-NAME で NO を抑制した状態でさらに CO も抑制することにより，mAb3221 の染色性が L-NAME 単独投与より減少したと考えることができる．これに対し INL や IPL など十分な NO の存在が予想できる部位では，L-NAME 存在下で ZnPP がほとんど影響を及ぼさないことから，NO が十分存在する状態では，定常状態の CO レベルは mAb3221 の染色性について影響を及ぼさなかったものと考えられる．このように NO，CO による sGC 活性化を組織の部位特異的に使い分けることには生理学的に意義があると思われる．仮に ELM 領域の cGMP が NO で制御された場合，低酸素状態において NO の寿命が延長することを考えると，このラジカル分子によってオキシラジカルに感受性のある視細胞内のレチノイドが分解されてしまう危険性がある．このように NO に代わって非ラジカルの sGC アゴニストである CO が定常状態における cGMP を維持しているものと仮説を立てることは不合理なことではない．NO に代わって CO が cGMP を維持する機構は，NO により障害を受けてしまう DNA が豊富に貯蔵されている精祖細胞における精子形成の調節や[18]，同じくオキシラジカルによって分解されてしまうビタミン A を豊富に蓄えている肝臓の伊東細胞における sGC の活性化においても示されている[25, 31]．

ZnPP により HO を阻害し内因性 CO 産生を抑制したことは，一見非生理学的処置のように思えるが，光照射実験と似て生理的状態に近い状態かもしれない．NO，CO や酸素分子などのガス状分子がヘム蛋白に結合する能力は光感受性であることはよく知られている[32]．これらのガスのなかでも CO はミオグロビンなどのヘム鉄に結合に関し，量子収量（Φ 値）が他者に比してはるかに大きい．このことは，CO は光照射により用意にヘム蛋白から分離することを意味している[32]．これに対し NO のΦ値は CO の約 0.1%でしかない．さらに光による CO の解離はヘム蛋白固有の性質である．これらのことから以下のような想定が可能である．ミュラー細胞やオン型双極細胞において，これらの細胞が可視光線にさらされると sGC は結合していた CO を解離し NO がこれに取って替わり sGC 活性を増加させる．この種のメカニズムがシナプス後の光情報伝達の微調整に貢献している可能性もある．

cGMPは網膜の光刺激による情報伝達において中心的な役割を担っているが，双極細胞における働きについてCOおよびNOによる調節の観点から以下に述べる．暗時において視細胞は脱分極しておりグルタミン酸を放出している．光刺激によって視細胞外節においてロドプシンが活性化されると，続く一連の反応を経てPDEが活性化され，cGMPが分解される．cGMP依存性の陽イオンチャネルが閉じることになり視細胞は過分極する．この視細胞におけるcGMP調節は通常pGCに支配されており，ガス状メディエーターを介したsGCによる調節を受けていない[33]．一方オン型双極細胞においては，暗時にグルタミン酸代謝型受容体（mGluR6）を介してPDEが活性化されているが，光刺激により視細胞からのグルタミン酸放出が減少すると，今度はPDEが抑制されることになりcGMP濃度上昇をきたし，陽イオンチャネルの開口により脱分極が起こると考えられている．今回，オン型双極細胞においてsGCの発現が確認されたが，光情報伝達における脱分極を引き起こすのに十分なcGMPを，この細胞では自らのsGCを介して供給している可能性が考えられる．光刺激によってCOがsGCから解離してNO依存性にsGC活性を増加させることは，光刺激に即応したcGMPの供給系として重要な役割を果たしていると考察された．

本研究では双極細胞における光刺激に伴うsGCの活性化と細胞機能の関連を十分に調べられなかったが，網膜の光情報伝達におけるギャップジャンクションの役割を勘案すると極めて興味深い可能性が提示できる[34, 35]．ギャップジャンクションはcGMPによって調節を受けることが知られており，オン型錐体双極細胞においては，光刺激により増加したcGMPがAIIアマクリン細胞とのギャップジャンクションを閉じて杆体双極細胞への伝達を制限し，中心窩における視覚情報解像度を上げている可能性が示唆されている[35]．従って実際には光刺激に伴う本細胞でのcGMPレベルはPDEによってもCOの光解離によっても制御されている可能性があり，今後のさらなる検討が待たれる．

最後に，今回*in vivo*で確認された様に，ガスによるsGC活性が組織内で不均一に調節を受けている様式は，網膜のみならず他の器官においても観察されるかもしれない．肝臓においては類洞内皮細胞から産生されるNOは，クッパー細胞などで生成されるスーパーオキシドによって消去されてしまうため，定常状態においては低く保たれている．このため肝臓においては肝細胞から産生される内因性のCOが主要な循環制御因子として働いている[25]．また，NOによるsGC活性化に対するCOの抑制効果は，HO-1を血管内皮細胞に特異的にトランスフェクトした高血圧症を引き起こすトランスジェニックマウスにおいて認められている[36]．sGC調節における酸化還元反応について最近の報告をみてみても[37, 38]，*in vivo*における局所sGC調節機構の全容解明については更なる研究が必要であろう．

総　括

網膜におけるNOおよびCOによるsGCの調節機構について調べるため，これらのガス生成系とsGCの分布を免疫組織学的に調べ，*in vivo*においてガス生成系を制御する薬剤を投与した時のsGC活性の変化を，抗sGCモノクローナル抗体，mAb3221を用いて解析し以下の結果を得た．

1．sGCはミュラー細胞とオン型双極細胞に発現していた．
2．網膜における主要なHO-2陽性細胞はミュラー細胞であることが分った．
3．HO阻害剤であるZnPP投与により内因性のCO産生を抑制するとmAb3221の染色性が著明に増加し，COが内因性NOに対し抑制的に働いていることが示された．
4．外境界膜はNO産生部位から比較的遠位に位置しており，L-NAME単独投与の時に比較して，ZnPPとL-NAMEの同時投与の方がmAb3221染色性を顕著に減少させ，NOの非存在下でも基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っていることが示唆された．一方，内顆粒層および内網状層においてはNO依存性にsGCが活性化されており，COがこれに対し抑制的にコントロールしていた．sGCが網膜の各層によって部位特異的に内因性ガスの調節を受けていることが示唆された．
5．In vitroの実験においてCOはNO濃度が低い時にはsGCを軽度に活性化しているが，NO濃度が高くなるとsGC活性に対し抑制的に作用していることが確認された．

稿を終えるにあたり，御指導，御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を直接御指導くださった慶應義塾大学医化学教室末松誠教授に深甚なる感謝の意を表します．さらに御協力，御指導いただきました慶應義塾大学医化学教室梶村眞弓先生に深謝いたします．

本研究の一部は第105回日本眼科学会総会シンポジ

ウムにおいて報告した．

文　献

1) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S：Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327：524-526, 1987
2) Ignarro LJ：Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide：a unique transduction mechanism for transcellular signaling. Pharmacol Toxicol 67：1-7, 1990
3) Denninger JW, Marletta MA：Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. Biochim Biophys Acta 1411：334-350, 1999
4) Yoshikawa S, Miyamoto I, Aruga J, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K：Isolation of a Drosophila gene encoding a head-specific guanylyl cyclase. J Neurochem 60：1570-1573, 1993
5) Koesling D, Friebe A：Soluble guanylyl cyclase：structure and regulation. Rev Physiol Biochem Pharmacol 135：41-65, 1999
6) Hobbs AJ：Soluble guanylate cyclase：the forgotten sibling. Trends Pharmacol Sci 18：484-491, 1997
7) Sharma VS, Magde D：Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide：a mechanistic model. Methods 19：494-505, 1999
8) Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D：YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. Mol Pharmacol 54：962-967, 1998
9) Brnett AL, Johns DG, Kriegsfeld LJ, Klein SL, Calvin DC, Demas GE, Schramm LP, Tonegawa S, Nelson RJ, Snyder SH, Poss KD：Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. Nat Med 4：84-87, 1998
10) Poss KD, Thomas MJ, Ebralidze AK, O'Dell TJ, Tonegawa S：Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. Neuron 15：867-873, 1995
11) Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH：Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 94：14848-14853, 1997
12) Ingi T, Cheng J, Ronnett GV：Carbon monoxide：a n endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. Neuron 16：835-842, 1996
13) Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B：Imm unohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 41：305-313, 2000
14) Cao L, Blute TA, Eldred WD：Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. Vis Neurosci 17：319-329, 2000
15) Tsuyama S, Yamazaki E, Tomita T, Ihara H, Takenaka S, Kato K, Kozaki S：Characterization of a novel monoclonal antibody that senses nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. FEBS Lett 455：291-294, 1999
16) Suzuki T, Suematsu M, Makino R：Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors. FEBS Lett 507：49-53,2001
17) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T,Suematsu M：Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. J Clin Invest 101：604-612, 1998
18) Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M：Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. J Clin Invest 109：457-467, 2002
19) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Komoda Y, Nakajima H：Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody. Biochim Biophys Acta 1289：110-114, 1996
20) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, Kyokane T, Goda N, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Suematsu M, Ishimura Y：Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. Am J Physiol 277：G1088-1096, 1999
21) Guidry C：Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 37：740-752, 1996
22) Vardimon L, Fox LE, Moscona AA：Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. Proc Natl Acad Sci USA 83：9060-9064, 1986
23) de la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A：L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. J Neurosci 15：3571-3582, 1995
24) Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M：Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. Gastroenterology 120：1227-1240, 2001
25) Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y：Carbon monoxide：an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. J Clin Invest. 96：2431-2437, 1995
26) Chun MH, Oh SJ, Kim IB, Kim KY：Light and electron microscopical analysis of nitric oxide synthase-like immunoreactive neurons in the rat retina. Vis

Neurosci 16 : 379-389, 1999
27) Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, Yoshimura N : Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 450-458, 1999
28) Ahmad I, Barnstable CJ : Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. Exp Eye Res 56 : 51-62, 1993
29) Haugh LM, Linsenmeier RA, Goldstick TK : Mathematical models of the spatial distribution of retinal oxygen tension and consumption, including changes upon illumination. Ann Biomed Eng 18 : 19-36, 1990
30) Lancaster JR Jr : Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 8137-8141, 1994
31) Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S,Tsuchiya M : Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. Microvasc Res 46 : 28-42, 1993
32) Antonini E, Brunori M : North-Holland Research Monographs : Frontiers of Biology.In : Neuberger A, Tatum EL eds.The derivatives of ferrous hemoglobin and myoglobin : Hemoglobin and myogrobin in their reactions with ligands. Amsterdam : North-Holland Publishing Company 13-39, 1971
33) Dizhoor AM : Regulation of cGMP synthesis in photoreceptors : role in signal transduction and congenital diseases of the retina. Cell Signal 12 : 711-719, 2000
34) Guldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Sohl G, Willecke K, Weiler R : Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. J Neurosci 21 : 6036-6044, 2001
35) Mills SL, Massey SC : Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. Nature 377 : 734-737, 1995
36) Imai T, Morita T, Shindo T, Nagai R, Yazaki Y, Kurihara H, Suematsu M, Katayama S : Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. Circ Res 89 : 55-62, 2001
37) Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab-H KM : Roles for NAD (P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. Respir Physiol 115 : 229-238, 1999
38) Kajimura M, Shimoyama M, Tsuyama S, Suzuki T, Kozaki S, Takenaka S, Tsubota K, Oguchi Y, Suematsu M : Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina. FASEB J express article 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003