

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	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0185">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0185</a>

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.

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)

しも やま まさる  
下 山 勝

(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<sup>1-4)</sup>。sGC は $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 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、 $\beta$ 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。 $\beta$ 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張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<sup>5-7)</sup>。

*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<sup>8)</sup>。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<sup>9-11)</sup>。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<sup>12)</sup>。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<sup>13, 14)</sup>。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、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) を腹腔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ンにて注意深く除去した後、網膜組織を水上にてさらに 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  $\mu$ m 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

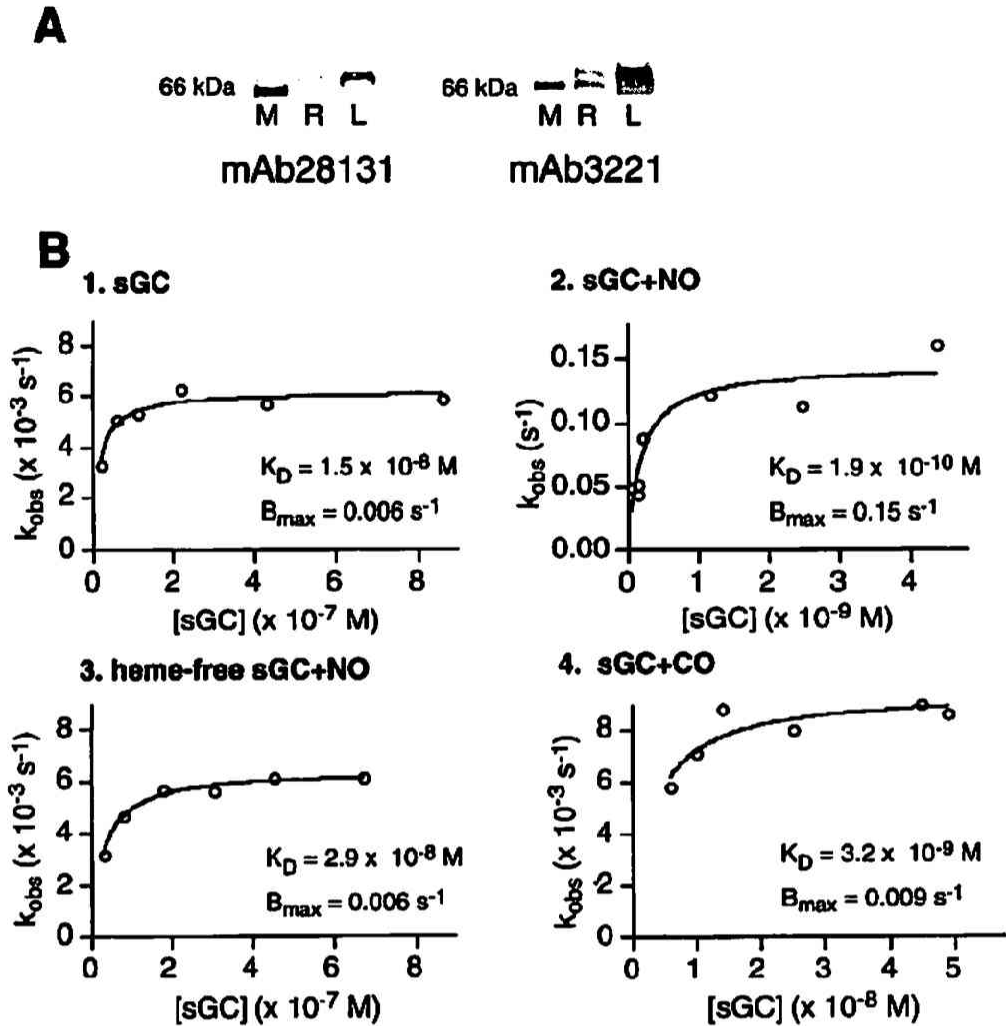
抗 sGC 抗体は、Tsuyama らの報告した抗ウシ sGC モノクローナル抗体 mAb28131 と mAb3221 を用いた<sup>19)</sup>。これらの抗体と精製 sGC との親和性を、resonant mirror biosensor (IAsys, Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge, UK) を用いて調べた。速度定数 ( $K_{on}$ ) はコンピュータープログラム (Fast Fit, Fisons) により求めた。解離定数と最高結合分子数をそれぞれ  $K_d$ 、 $B_{max}$  で表すと、速度定数  $K_{on}$  と sGC 濃度  $[sGC]$  の関係は  $K_{on} = B_{max} \cdot [sGC] / (K_d + [sGC])$  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, Wave-Metrics, 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<sup>19)</sup>。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<sup>19)</sup>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  $\mu$ g/ml, 30  $\mu$ g/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°C 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<sup>17, 18)</sup>。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 IX $\alpha$  (以下 BRIX $\alpha$ ) 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<sup>19, 20)</sup>。BRIX $\alpha$  は、HO の特異的な分解産物であるビリベルジン IX $\alpha$  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<sup>19)</sup>。

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 に対してはマイクロソーム分画を、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マイ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  $\alpha$  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)  $\alpha$  抗体, MC5 (1  $\mu$ g/ml ; Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) を PBST で溶解し、4  $^{\circ}$ C で一晚網膜切片と反応させた。抗 CAII 抗体と抗 PKC $\alpha$  抗体はそれぞれミユ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<sup>13, 21~23)</sup>。

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、PKC $\alpha$  に対しては PE 標識ヤキ抗マウス 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  $\mu$ g/ml; 持田蛋白精製工業, 群馬)。Nikon Diaphot 300 倒位型蛍光顕微鏡 (油浸対物レンズ; 開口数 1.4, 60 $\times$ Nikon 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<sup>17, 20)</sup>。

#### 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  $\mu$ mol/kg body wt., N<sup>ω</sup>-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (以下 L-NAME) 85  $\mu$ mol/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<sup>18)</sup>。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  $\mu$ m) 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  $\mu$ m 離れた部位と, 上方 600  $\mu$ m 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 (Nikon, 40 $\times$ Nikon Plan Fluor 対物レンズ, 開口数 0.75) を用いて Nikon FDX-35 カメラで撮影した。視野絞りは 0.6 とし、露出時間は Nikon 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 活性の部位特異的变化を評価するために二つのプロトコルを施行した。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る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  $\mu$ m の異なる 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 $33 \pm 2 \mu\text{m}$ 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<sup>16)</sup>。反応液は、5mM MgCl<sub>2</sub>、3mM dithiothreitol、1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1mM GTP、2.5 nM sGCを含む40 mM TEA-HCL buffer (pH7.4)を用いた。酵素は37°C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<sup>16, 25)</sup>。

## 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

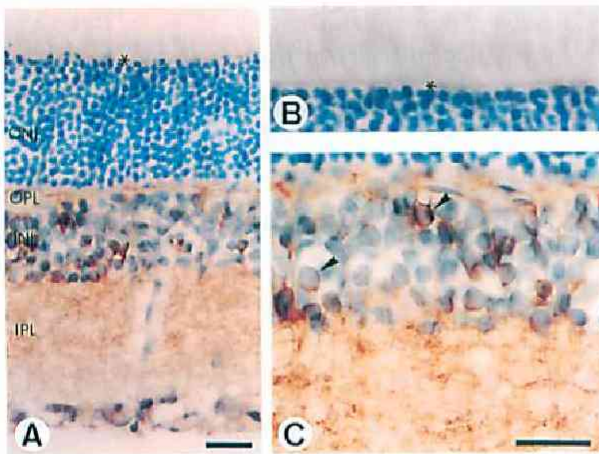
第1図に抗ウシsGC抗体mAb3221とmAb28131の特徴を示した。Panel Aのごとくウェスタンブロット解析で、両抗体はラット網膜組織に免疫陽性反応を示すが、両者は違ったパターンを示している。mAb28131は76kDaに主要なバンドを1つ示している。これはsGCのβ鎖に対する反応を示している。これに対し、mAb3221は76kDaの他に66-68kDaと2つの陽性バンドを認める。これは、サンプルの蛋白質を調整した後でもα鎖とβ鎖の両方に反応することを示している<sup>15)</sup>。ペプチドマッピング解析の結果、mAb3221の認識に関与するエピトープは、α鎖の

S361-K368 (SSRVMDLK)とβ鎖のG128-K151 (GKGLILHYYSEREGLODIVIGIHK)であった<sup>15)</sup>。

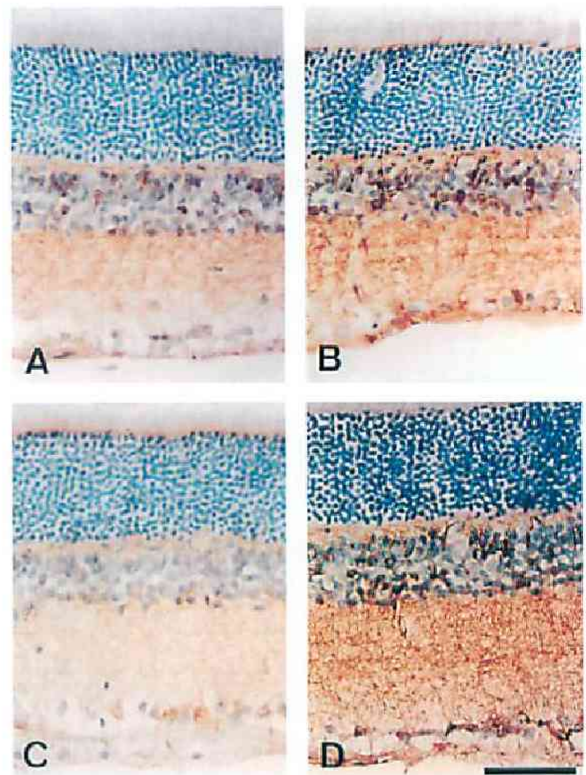
以上のことからmAb3221はsGC蛋白の二つのサブユニットによって決定される特異的な蛋白構造を認識している可能性が示唆された。sGC酵素とmAb3221との反応を定量化するため、精製したsGCと固相化したmAb3221を用いてバイオセンサーテクノロジーを用いて解析した。第1図のPanel Bは、0.05-860 nMのsGC濃度に対する結合分子数 $K_{0.5}$ を示している。解離定数 $K_d$ と最大結合値 $B_{max}$ はNOもCOも存在しないコントロール状態では、 $K_d$ は $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $B_{max}$ は $0.006 \text{s}^{-1}$ であった(Part 1)。充分なNO存在下では $B_{max}$ は $0.15 \text{s}^{-1}$ と著明に上昇し、 $K_d$ 値は $1.9 \times 10^{-10} \text{M}$ 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 $3.2 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $B_{max}$ は $0.009 \text{s}^{-1}$ 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サイ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<sup>15)</sup>。

## 2. 網膜におけるsGC発現細胞の同定

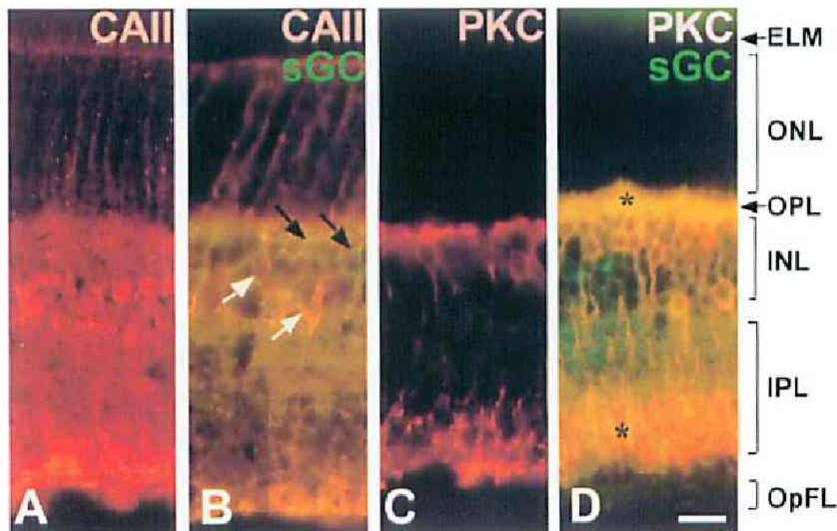
第2図は、β鎖のみを認識するmAb28131抗体を用いた染色によりsGCの分布を示したものである。陽性細胞はELMからOpFLまでの幾つかの層にまたがって認められる(Panel A)。これに対し視細胞の細胞体の存在する外顆粒層(outer nuclear layer, 以下ONL)にはほとんど反応が見られなかった。Panel Bにみられるようにミュラー細胞の微絨毛が視細胞内節と接着帯を形成しているELM部位に免疫反応陽性を示した。INLには細胞体を取り囲まれるように強陽性に染色される細胞を認めた。経静脈的に過剰なL-NAMEを投与した場合においても、mAb28131の染色性の変化は認められなか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



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  $\mu$ m。（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  $\mu$ m。（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：PKC $\alpha$ 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：PKC $\alpha$ 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  $\mu$ m。（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 PKC $\alpha$  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、PKC $\alpha$  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 PKC $\alpha$  の二重染色を示す。幾つかの細胞が sGC と PKC $\alpha$  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る。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

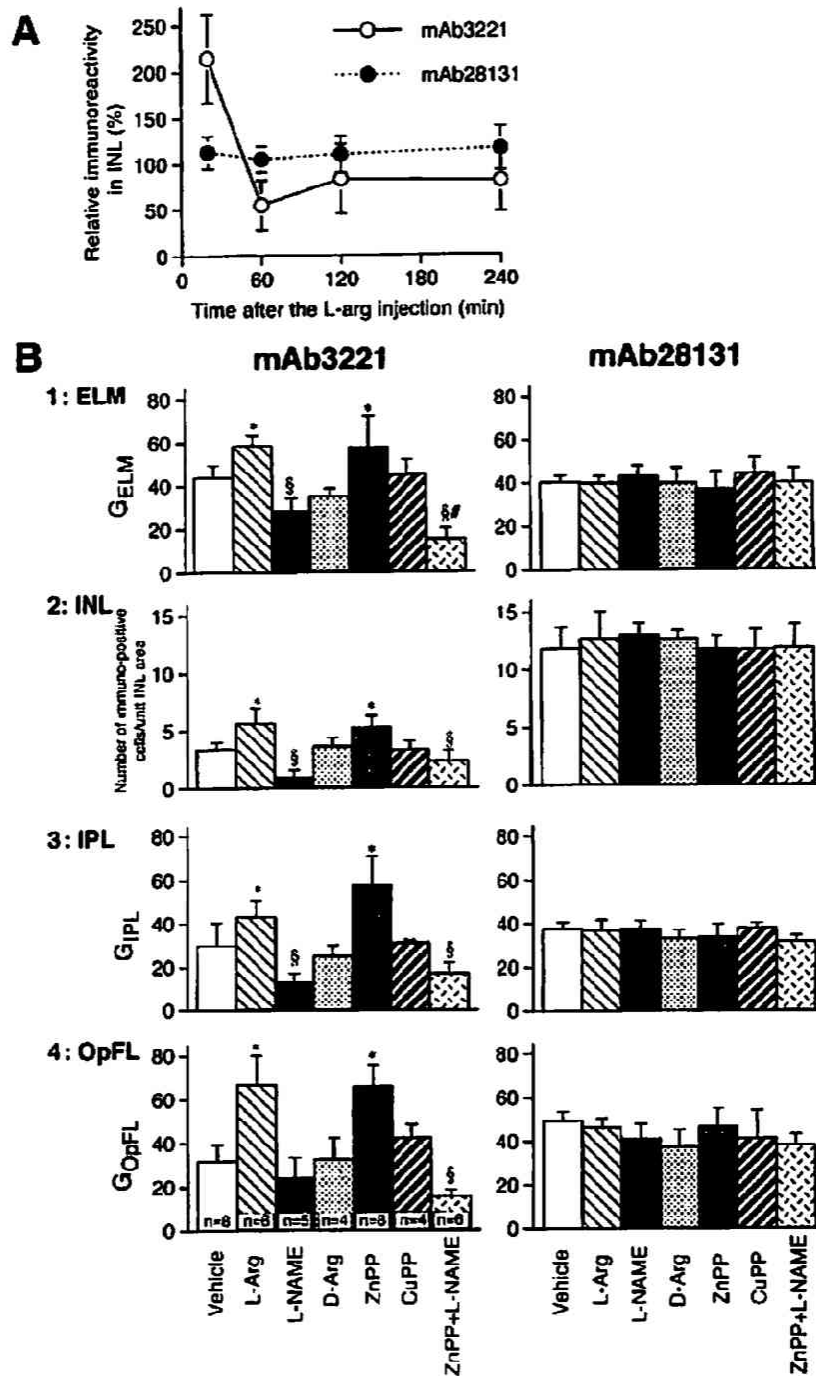
が確認された。またこのような染色性の変化はアセトン固定、ホルマリン固定を施した標本では検出できないため、ここに示した固定法であれば sGC の活性を反映した変化をひろえるものと判断した。

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の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)

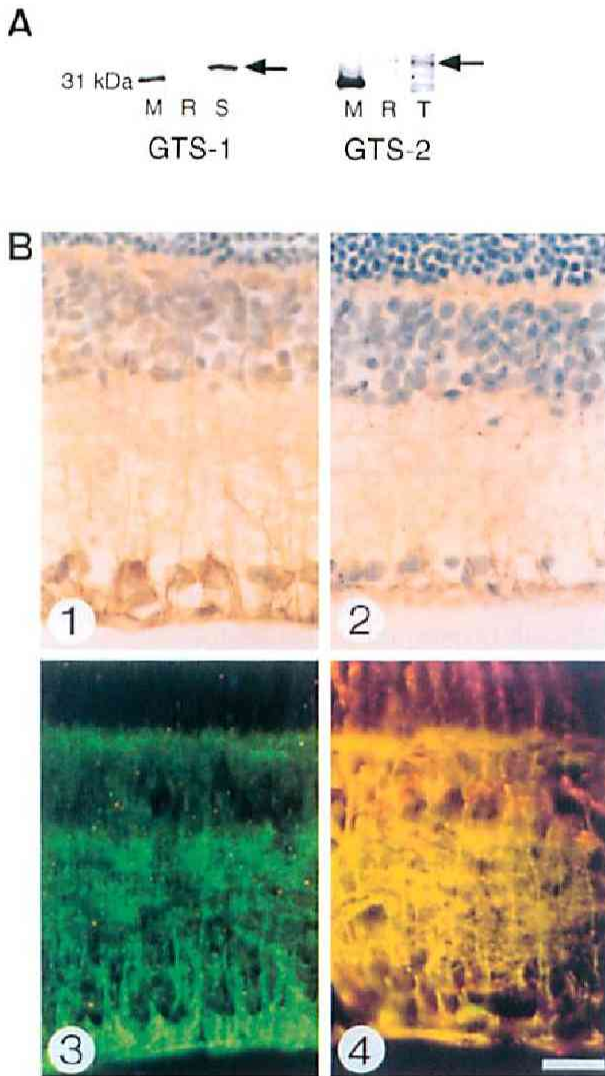
においては、NOの非存在下でも基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っていることを示唆している。これに対し、INLおよびIPLにおいては両薬剤同時投与群は、L-NAME単独で処理した群と比較しても有意差を認めず、これらの部位においては基礎的レ

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。

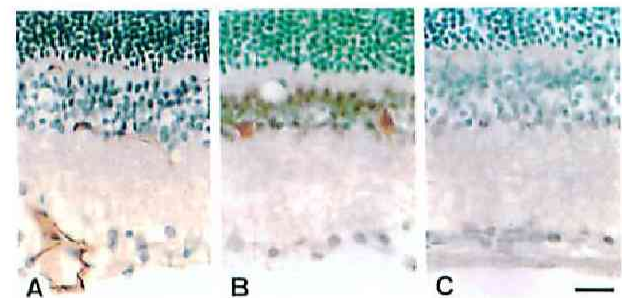
#### 4. 網膜におけるガスモノオキシド産生部位の免疫組織学的検討

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IX $\alpha$ 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。

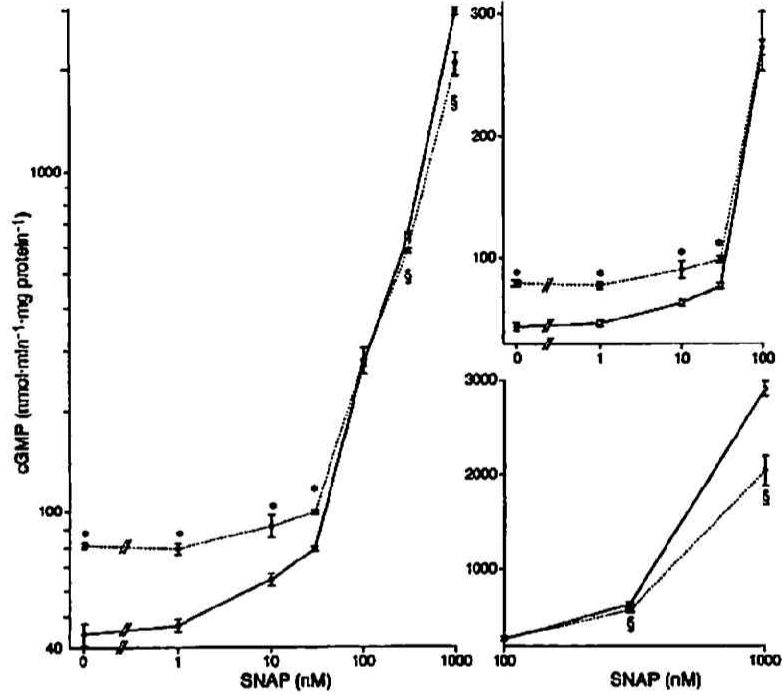
第7図にラット網膜におけるNO産生系についての染色結果を示す。抗eNOS抗体では硝子体腔寄りの比



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  $\mu$ m。(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)



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  $\mu$ m。(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回の実験の平均値を示した。(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<sup>26, 27)</sup>、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  $\mu$ M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  $\mu$ M 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  $\mu$ M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がミュー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<sup>28)</sup>。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<sup>29)</sup>、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 BRIX $\alpha$  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<sup>30)</sup>、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<sup>30)</sup>。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 BRIX $\alpha$  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<sup>18)</sup>、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<sup>25, 31)</sup>。

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态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<sup>32)</sup>。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 ( $\Phi$  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<sup>32)</sup>。これに対し NO の  $\Phi$  値は CO の約 0.1% でしかない。さらに光による CO の分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 を分離し 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<sup>39)</sup>。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えられた。

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<sup>34, 35)</sup>。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<sup>35)</sup>。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子は、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<sup>25)</sup>。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<sup>36)</sup>。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も<sup>37, 38)</sup>、*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はミユ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陽性細胞はミユ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、御高閣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榎村真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 : an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 16 : 835-842, 1996
- 13) Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B : Immunohistochemical 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 myoglobin 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 All 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