

Title	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
Sub Title	
Author	下山, 勝(Shimoyama, Masaru)
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.24-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0024">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0024</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.

# 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

下山 勝

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

【目的】可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) は、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などのガス状モノオキسدが結合することによって活性化されるが、COによるsGC活性化は、*in vitro*ではNOに比べてはるかに弱いとされている。*in vivo*において、NO依存性のsGC活性化にCOが影響を及ぼしているとの報告があるが、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。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、sGC活性化機構における内因性ガスCOとNOの相互作用を調べることを目的とした。

【方法】2種類の抗sGCモノクローナル抗体、 $\beta$ 鎖を認識するmAb28131と活性化の状態を識別できるmAb3221を用いてラット網膜におけるsGCの免疫組織学的局在を調べた。ガス生成系酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO) とNO合成酵素 (NOS) の発現についてもモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。内因性のガス生成系に影響を及ぼす薬剤、L-アルギニン、N<sup>o</sup>-ニトロ-L-メチルアルギニンメチルエステル (L-NAME)、亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP) をラットに投与し、網膜各層におけるmAb3221の染色性の変化を半定量的に解析した。また、*in vitro*において、ウシから精製したsGCにより産生されたcGMP量をenzyme-linked immunosorbent assayを用いて測定し、NOおよびCOによるsGC活性化の程度、およびそれらの相互作用を調べた。

【結果】免疫染色の結果、ミュラー細胞とオン型双極細胞にsGC発現が認められた。網膜におけるHO-2の主要な発現細胞はミュラー細胞であった。nNOSはアマクリン細胞に発現が認められた。染色性の半定量的解析の結果、L-アルギニン投与のみならずHO阻害剤であるZnPP投与によってもmAb3221の染色性が著明に増加した。外境界膜においてはL-NAME単独投与の時に比べて、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が、この相乗効果は内顆粒層および内網状層では認められなかった。*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たが、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。

【結論】ミュラー細胞は、sGC含有細胞であると同時にHO-2も発現していることが確認された。外境界膜では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が示され、網膜の各層においてsGCはオートクラインおよびパラクラインの調節を受けていることが示唆された。また、*in vitro*の実験からもNOによるsGC活性化に対してCOが調節的役割を果たしていることが確認された。

cGMPは網膜における光情報伝達において中心的な役割を果たしている。視細胞ではcGMP生成系として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 (pGC) が知られており、ホスホジエステラーゼ (PDE) による調節を受けている。しかしながら他の神経細胞や支持細胞におけるcGMP生成系については蛋白局在および調節機構に関して不明な点が多く残されていた。

本研究では、ラット網膜組織において、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) がミュラー細胞とオン型双極細胞に発現していることが確認された。また、内顆粒層および内網状層においては、sGCはNO依存性に活性化されており、COがこれに対し抑制的にコントロールしていることが確認された。一方外境界膜では、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おり、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解明された。

審査においては、まず免疫染色を用いてsGC活性の定量化が可能か質問された。これに対し、本研究において確認されたsGCの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、今回示した固定法を用いればNOの結合に伴うsGCの活性化を意味する蛋白の構造変化を反映した変化を拾い上げると回答された。これに関し、他の方法で定量が可能であるか質問があり、培養細胞を用いてcGMP量を定量する方法も技術的には可能であるものの、その局在を解明することはできず、今回の方法はそれを補完するものと回答があった。さらに、NOS陽性細胞として確認された血管内皮細胞やアマクリン細胞から産生されるNOが、sGCの局在するミュラー細胞や双極細胞に影響を及ぼすか質問された。これに対しては、NOの拡散距離および半減期は、血流や酸素濃度の状態に左右されるため生理的狀態で実際に影響を及ぼす距離およびその濃度は不明であるが、NOがthiolと複合体を形成して輸送、分泌されることにより組織内を移動する可能性があることと回答された。この他、免疫染色における陽性細胞同定については二重染色のみならず、ミュラー細胞においてはCa<sup>2+</sup>、HO2、sGCの3重染色を行うと明解になるとの助言があった。また、sGCの局在に関してミュラー細胞と双極細胞は同定してあるが、他の細胞での発現がないことの証明が必要であることが指摘された。また今回確認された内因性ガスによるsGCの活性化調節がpGCを介した光情報伝達に与える影響、さらにはオン型双極細胞においてsGCが発現している意義について考察が不十分である事が指摘されたため加筆訂正を行うものとした。以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題が残されているが、内因性ガスメディエータによるsGCの調節機構について、*in vitro*、*in vivo*双方の系を用いて系統的に検討されており、神経組織におけるガス分子を介した情報伝達機構に関して新たな研究分野を展開させる可能性もあり興味深くかつ有意義な論文であると高く評価された。

論文審査担当者 主査 医化学 末松 誠  
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範  
病理学 岡田 保典  
学術確認担当者: 北島 政樹、岡野 栄之  
審査委員長: 岡野 栄之  
研究指導者: 小口 芳久 (眼科学)

試問日: 平成16年 6月23日