

- 31 Taoka S, and Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase. *J Inorg Biochem* 87: 245-251, 2001.
- 32 Zhao W., Ahang J., Lu Y., and Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 20. 6008-6016, 2001.
- 33 Zou CG, and Banerjee R. Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* 278: 16802-16808, 2003.

Figures and Legends

Figure 1 Characterization of antibodies used in the study and immunohistochemistry illustrating the expression of CBS in rat testes.

Panel A. Western blot analysis showing specificity of the anti-CBS and anti-CSE Abs. CBS and CSE were evident in the liver samples at 63 kd and 40 kd, respectively. V: vehicle-treated controls. Cd: cadmium-treated groups. m: molecular markers. Panel B. Immunohistochemical analysis of the topographic distribution of CBS in the rat testis. Panel C. Double immunostaining with Ad4BP (purple) and CBS (brown). Note marked expression of the enzyme in Ad4BP-positive cells in the interstitial space, suggesting the presence of CBS in Leydig cells. (D) Effects of administration of CdCl₂ on the expression of CBS in rat testes. Note the absence of the alterations. Bars=100 μm

Figure 2 Localization of CSE in the rat testis.

Panel A: Low-power representative picture showing Immunohistochemical analysis indicates thlocalization of CSE in the rat testis. Panel B: High-power representative picture showing the enzyme expression. Note the presence of CSE in Sertoli cells and immature germ cells standing close to the seminiferous tubules, while mature cells located in the central portion of the tubules exhibit little expression, if any. Note marked expression of CSE in vascular smooth muscle cells in the interstitial space (arrows in the panel B). Bars=100 μm

Figure 3 Schematic diagram showing alterations in the remethylation and transsulfuration among rats treated with vehicle and CdCl₂ (V and Cd).

Σremethylation[#]: the sum of the methionine, S-adenosyl methionine, S-adenosyl homocysteine. Data indicates the mean ± SD of separate experiments. *p<0.05 as compared with data collected from control rats treated with vehicle.

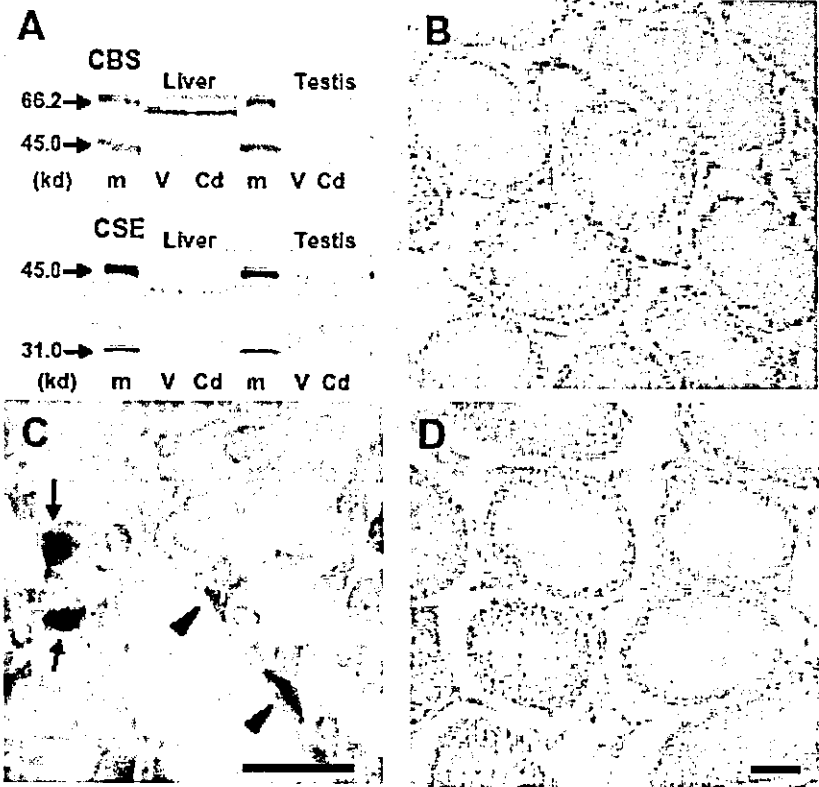


Fig 1

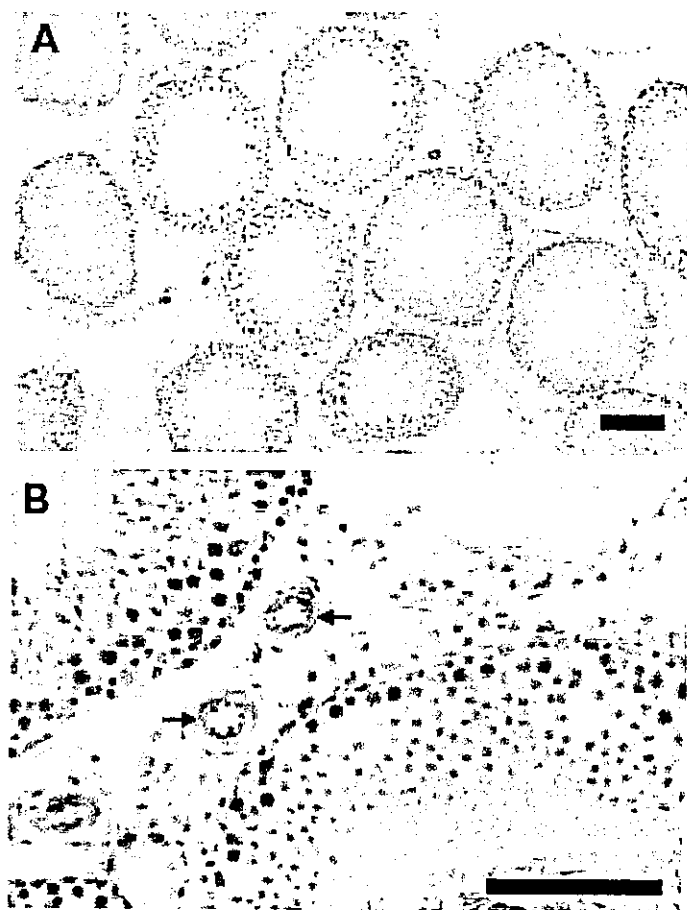


Fig 2

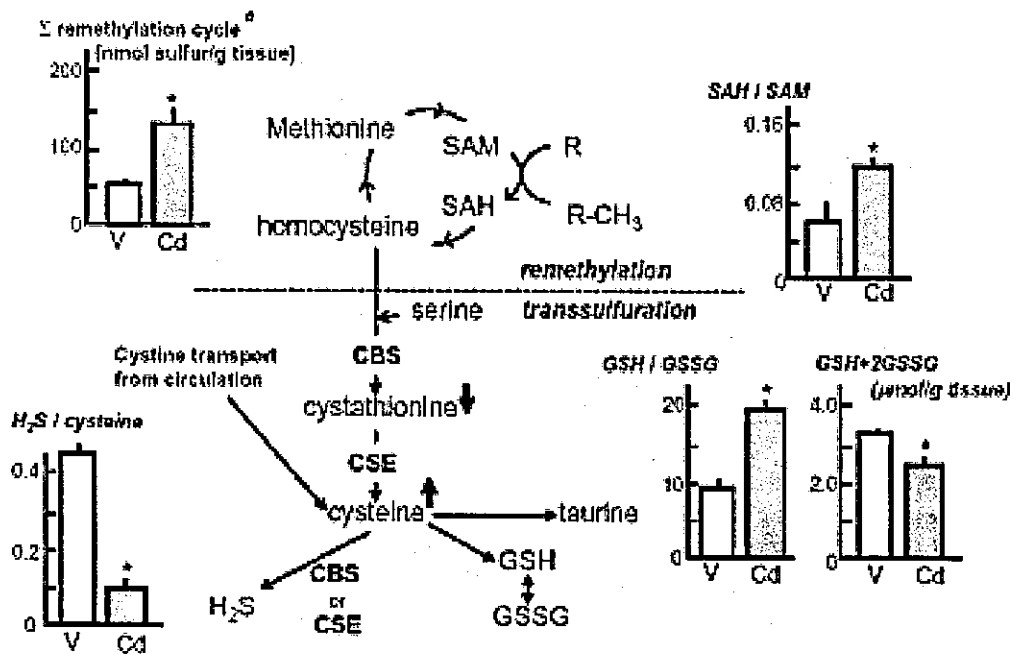


Figure 3

Table 1

Analyses of sulfur-containing amino acid metabolism in rat testes treated with vehicle and CdCl₂.

Metabolites (nmol/g tissue)	Vehicle	CdCl ₂
<u>Remethylation metabolites</u>		
Methionine	25.2±2.8	114.6±8.2 [*]
S-adenosyl methionine	24.1±1.1	22.8±2.3
S-adenosyl homocysteine	1.6±0.2	2.2±0.1 [*]
homocysteine	n.d.	n.d.
Serine	427.4±31.4	694.6±63.7 [*]
<u>Transsulfuration metabolites</u>		
Cystathionine	12.6±0.7	9.4±1.4 [*]
Cysteine	29.5±7.1	132.1±16.5 [*]
H ₂ S	19.6±0.7	19.2±1.8
GSH	2531±89	2300±79
GSSG	284±14	128±13 [*]
Taurine	1182±140	1021±102

Data represents mean ±SD of 4-13 separate experiments. *P<0.05 as compared with data collected from the vehicle-treated control rats.

Table 2 Alterations in plasma concentrations of homocystine, cysteine and glutathione in rat testes treated with vehicle and CdCl₂.

Plasma concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	Vehicle	CdCl₂
homocystine	9.8\pm0.5	8.1\pm0.5 *
cystine	178.8\pm6.0	147.9\pm4.0 *
glutathione	21.2\pm0.9	19.6\pm0.7

Data represents mean \pm SD of 5-6 separate experiments for each group. *P<0.05 as compared with data collected from the vehicle-treated control rats.

ガス状メディエーターの生体内挙動

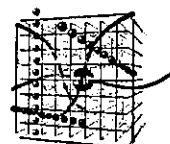
Mayumi Kajimura ◎ 梶村真弓

Satoshi Kashiwagi ◎ 柏木 哲

Mio Ichikawa ◎ 市川美緒

Makoto Suematsu ◎ 末松 誠

慶應義塾大学医学部医化学



Summary

NO が生体内で生理活性を持つことが発見されて以来、ガス状メディエーターによる情報伝達が注目されるようになったが、ガス分子による生体機能制御機構の分子レベルの実体については不明な点が多い。そこで、神経・血管系におけるガスの生成、および受容機構を包括的に解明することを目指し、ガス分子の生体内での視覚化、およびガスシグナリングを受容体の活性化を output として imaging することに取り組んだ。本稿では、細胞内セカンドメッセンジャーである cGMP の生成反応を触媒するヘム酵素、sGC のガス分子による活性調節機構を取り上げる。sGC 活性は NO や CO によって増強されることが報告されているが、NO と CO が共存する *in vivo* の系での本酵素の活性調節機構については未解明で、CO が NO 依存性の sGC 活性化を synergistic あるいは逆に antagonistic に制御するかは論争的である。問題解決の糸口として、われわれは CO による二面的な sGC 活性制御機構という新概念を提唱する。

Key words

- ◎ガスセンシング
- ◎可溶性グアニル酸シクラーゼ
- ◎一酸化窒素(NO)
- ◎diaminofluorescein
- ◎一酸化炭素(CO)

はじめに

ガス状メディエーターは、生体内で生成される低分子で、細胞膜を他の物質に比べて容易に通過して、蛋白質や脂質・糖質・核酸などの他の生体構成成分と特異的に結合する分子群である。このような分子群のうち一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)は、血管弛緩作用など循環系恒常性維持のために不可欠なガス状メディエーターであり、生体恒常性維持に重要な役割を担っている。多くの研究者がその生物活性の解析に力を注いだ結果、少なくとも NO に関しては、その target molecule の同定および分子レベルでの活性化制御のメカニズムが明らかにされてきた。反面、微小循環系でのこれらガス分子の実際の bioavailability やアイソフォーム特異的な合成酵素の局在については、不明な点を多く残してきた。さらに、ガス分子を生成する酵素系や受容系の多くは、他のガス生成反応と拮抗あるいは共役している例が多数存在するにもかかわらず、その生物学的・病態生理学的意義は依然手付かずの領域である。

そこで本稿では、われわれの最近の実験結果を示しながら、上述した未解明な部分に焦点を当てた議論を

展開したい。まず初めに、微小循環系での NO 生成を *in situ* で視覚化し、半定量的な解析を行ったことにより得られた新たな知見を紹介する。次に、NO の target molecule である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 活性化に伴う構造変化を認識する抗 sGC 単クローン抗体 (mAb3221) を用いた、免疫組織化学的メカニスティックプロービングという全く新しいアプローチにより、ラット網膜組織における sGC による *in vivo* ガスセンシングの空間的解析を試みた結果を紹介しながら、生体内での NO・CO の制御分子としての役割を統合的に考察する。

微小循環内での NO の delivery

1. 従来の概念

NO が short-lived の内因性に産生されるシグナル分子として初めて認識されて以来、「ガス分子による情報伝達」という新しい原理が確立された。しかしながら、NO がどこで産生され、何によってどのような手段で運ばれ、どこで作用するのか、という delivery に関する制御機構の解明や生体内での量的な議論はあまりなされていない。NO delivery に関する領域がほとんど手付かずであった要因のひとつとして、*in vivo* の実験系で NO の定量をする技術が立ち遅れてきたことが挙げられる。そこでわれわれは、微小循環内での NO 量を空間的局在を考慮して測定できる実験系の構築を目指した。

生体内の NO 産生は、1 型(神経型 NOS ; nNOS)、2 型(誘導型 NOS ; iNOS)、3 型(内皮型 NOS ; eNOS) の 3 つの NO 合成酵素(NOS) に依存している。微小循環系での NO の果たす役割は、血管弛緩による血流制御、不必要な血小板凝集や白血球の内皮への接着の抑制、肥満細胞脱顆粒の抑制、血管透過性の制御と枚挙に暇ない。従来の概念では、これらの微小循環内の NO は、ほとんど血管内皮細胞の eNOS 由来のものと考えられてきた。また、vascular tree の中で抵抗を調節する機能を有する比較的小さいサイズの

細動脈壁では NO はあまり出ておらず、この部分の弛緩性は endothelial-derived hyperpolarizing factor(EDHF)によって保たれているという概念が主流であった¹⁾。しかしながら、われわれの実験結果はこれらの既成の概念に反し、細動脈壁での NO の存在を示したのみならず、内皮細胞に由来しない NO の source の存在を強く示唆するものであったのでここで紹介する²⁾。

2. *In situ* での NO の視覚化:

ラット腸間膜微小循環系をモデルとして

NO 生成を *in situ* で、しかもリアルタイムで視覚化するため、細胞内で生成されるニトロソニウムイオン(NO⁺)を感知する能力のある 4, 5-diaminofluorescein diacetate(DAF-2DA) を NO プローブとして用いた laser confocal microfluorometry を行った。ジアセテート型の DAF-2DA は non-fluorescent だが細胞膜透過性が高く、いったん細胞内に取り込まれるとエステラーゼによって加水分解を受け DAF-2 に変換される。DAF-2 は、NO⁺ と反応してトリアゾール型の DAF-2T になると強い蛍光を発する³⁾。図 1 A に示すように、ラット腸間膜微小循環系において、NO⁺ 由来の蛍光の時間依存的上昇を *in situ* で捉えることに成功した。内因性に産生された NO の集積は、細動脈壁でも細静脈壁でも起きていることに加えて、間質の肥満細胞でも顕著であることが明らかになった。

3. 細動脈壁における内皮細胞非依存性の NO の存在

これらの NO の source を検討するため、ラット腸間膜組織で eNOS および nNOS の局在を免疫組織学的に検証した。興味深いことに、eNOS は比較的大きい細動脈(100 μm 以上)内皮細胞に発現しているものの、比較的小さい細動脈(40 μm 以下)内皮細胞には全く発現が認められなかった。一方、nNOS が細動脈壁に沿って走る神経線維様の細胞に、また肥満細胞にも強発現していることが判明した。こ

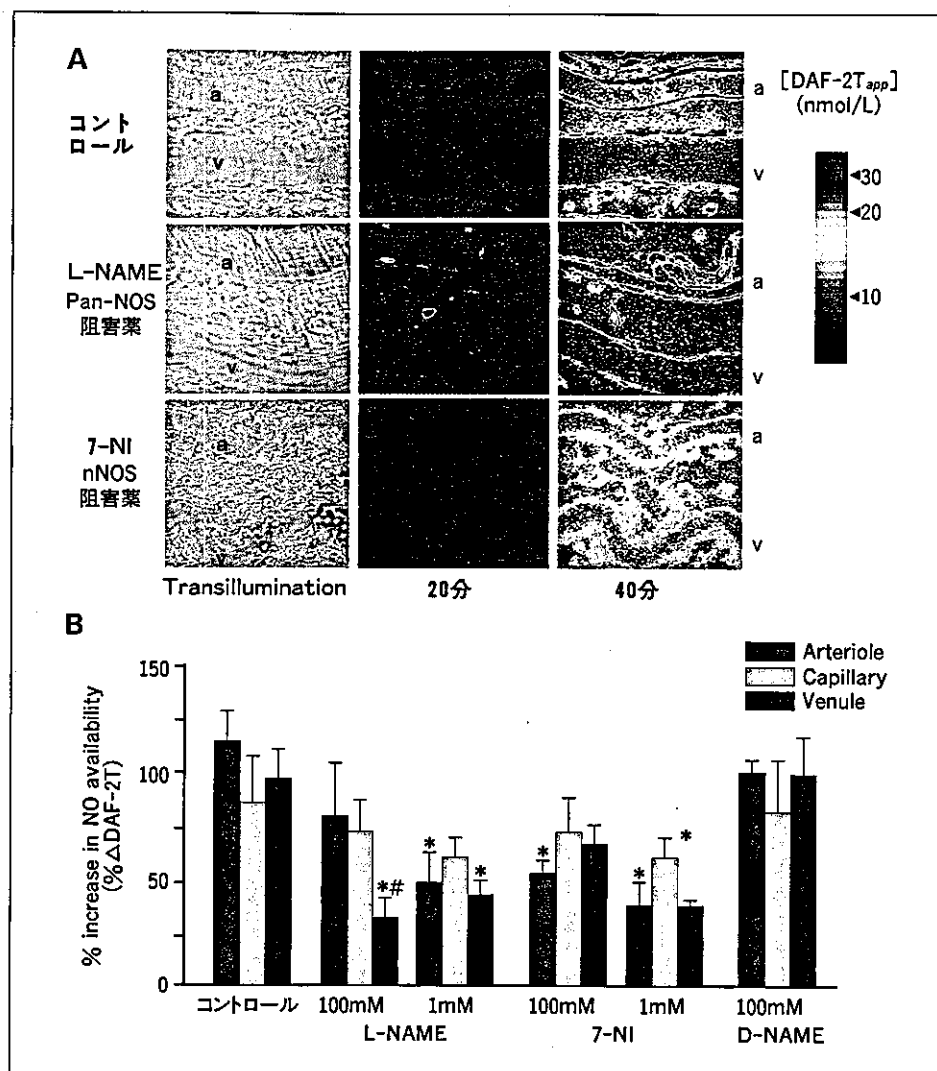


図1. ラット腸間膜微循環内のNO分布
A: ニトロソニウムイオン(NO⁺)感知性の蛍光プローブ diaminofluorescein (DAF) を用いた laser confocal microfluorograph. a: 細動脈, v: 細静脈.
B: NOS 阻害薬投与による DAF 依存性蛍光の半定量的解析. *: p < 0.05 コントロールの細静脈との比較, #: p < 0.05 細動脈との比較 (文献2より改変引用)

の知見はラット脳組織でも同様であった。つまり、前(1.)で述べた、vascular treeの中で抵抗を調節する機能を有する比較的小さなサイズの resistance arteriole では、NOに依存しない EDHF 依存性の弛緩が主であるという従来の概念を覆すものとなった。nNOS由来のNOの存在が見過ごされてきた要因として、多くの実験が、神経支配や間質の細胞などが除去された isolated perfused vessel の実験系でなされてきたことにあると考えられる。

細静脈や毛細血管の内皮細胞には eNOS が高発現しており、この部位でのNOは血管内皮細胞由来であると考えられる。汎NOS阻害薬である N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 表面灌流により顕著に起こる細静脈壁での白血球のローリングや接着が、nNOSを比較的選択的に抑制する7-nitroindazole (7-NI) の表面灌流によっては惹起されない事実は、このことを支持するものである。以上まとめると、細静脈側では従来の概念どおり eNOS 依存性の frac-

tionが大部分であると考えられるが、細動脈側では全く逆にnNOS依存性のfractionが大きくなっていると推察された。

さらに、アイソフォーム特異的なNO生成の*in situ*マッピングをするため、汎NOS阻害薬L-NAMEあるいはnNOS阻害薬である7-NIの表面灌流後、局所におけるNO⁺依存性の蛍光の量的変化を検討した。その結果、L-NAMEによるNO生成の減少は、細動脈壁に比べて細静脈壁で顕著である一方、7-NIによる減少は、細動脈壁と肥満細胞で顕著であることが判明した(図1B)。NOのtarget moleculeであるsGCが局在する血管平滑筋細胞内のNO濃度を、物理化学的な理論計算を行うことにより推定したNO拡散モデルによると、われわれが明らかにした血管平滑筋の外層に位置している神経末端にNOのsourceがあると仮定すると、既存の実験データにより近い推定値が得られるという最近の報告もある⁹⁾。

今回のデータのもうひとつの興味深い点は、高濃度のL-NAME投与後もNO生成を完全に抑制するような阻害は起こらず、最小でも約40%、NO生成は増加した事実である。このことから、NOS阻害薬に非感受性のNO-fractionが存在することが推察される。われわれは、たとえば酵素以外のNOのreservoirの存在の可能性を示唆するものであると解釈している。この酵素非依存性NOのsourceの同定については、今後の研究展開に委ねるところである。

sGCによる*In vivo*ガスセンシングの空間的解析

1. NO・COによるsGC活性化のメカニズム

sGCは、GTPからcGMPを産生する反応を触媒する酵素であり、種々の組織の可溶性画分に存在する。補欠分子としてヘムを有するこの酵素の活性は、NOがヘムに結合することによって100~200倍に増幅される。生じたcGMPは細胞内のセカンドメッセンジャーとして陽イオンチャンネルに結合し、イオンの膜透

過性の調節をしたり、蛋白質リン酸化酵素を活性化するなどの作用が知られ、血管平滑筋弛緩や血小板凝集抑制などに関与する重要なシグナル分子である^{5,7)}。

sGC活性化のメカニズムの詳細は本酵素の結晶構造解析を待たねばならないが、分子的性質が比較的よく解明されているウシ肺から精製されたsGCの構造生物学的解析により、これまでに蓄積された知見を記す。sGCは α 、 β の2つのサブユニット(各々70~88 kDa)からなるヘテロダイマーである。これらのC末端は膜結合型グアニル酸シクラーゼやアデニル酸シクラーゼの反応触媒部位と同一性があり、この酵素の反応触媒部位であると考えられている。sGC活性化において重要な役割を担うヘム補欠分子内の鉄イオンは β サブユニット上に配位しており、ラット β サブユニットではN末端側のヒスチジン(H105)が近位軸配位アミノ酸残基である⁸⁾。NOがこの還元型ヘム鉄に遠位側より第6配位子として結合すると、ヘム鉄-H105配位の断裂が起き、5配位型NO複合体を形成することが分光学的解析により明らかになった^{8,9)}。シクラーゼ触媒部位の活性化のメカニズムに関しては不明であるが、この近位配位子の切断によりH105がフリーになることにより起こるsGCのconformation変化が、触媒反応活性化の重要な第一ステップであると考えられている^{10,11)}。一方、COも β サブユニット上ヘム鉄の第6配位子として結合するが、ヘム鉄-H105配位の切断は起こらず、6配位型CO複合体を形成する。これに伴う構造変化はわずかであると考えられ、酵素活性の増幅は2~3倍とNOの活性能に比べて非常に低い^{12,13)}。これらの知見は、*in vitro*の精緻な物理化学的手法を駆使した実験データに基づいて得られたものであるが、生体内での活性調節機構の分子レベルの実体について検証を試みた例はきわめて少ない。

2. sGC酵素活性化感知型単クローン抗体： mAb3221

sGCの活性化を*in situ*で視覚化するため、mAb

3221 および mAb28131 という 2 種類のユニークな性質を持つ抗 sGC 単クローン抗体を用いた。これら 2 種類の抗体でラット網膜組織の可溶性画分のウェスタンブロット解析を行うと、両抗体とも陽性所見を呈する。しかしながら、プロッティングパターンは全く異なり、mAb28131 では 76 kDa 付近に 1 本だけバンドが現れるのに対して、mAb3221 では 2 本のバンドが検出された(図 2 A)¹⁴⁾。Tsuyama らが行ったペプチドマッピングによると、mAb3221 は α サブユニットの S361-K368(SSRVM DLK)のみならず、ヘム結合部位(H105)に近い β サブユニットの G128-K151(GKGLILHYYSEREG LQDIVIGIHK)をも認識することが確認されている¹⁵⁾。このことから、mAb

3221 のウェスタンブロットで検出される 2 本のバンドは、 α 、 β サブユニットにそれぞれ対応すると推察される。

mAb3221 が、 β サブユニット上の H105 近傍のアミノ酸残基を認識することから、われわれはこの抗体が sGC 活性増幅の際、ヘム鉄-H105 配位の切断がきっかけとなって起こる conformation 変化を感知する能力があるのではないかと考え、次のような実験を行った。ウシ肺より精製した sGC 精製標品を用い、抗体との相互作用を surface plasmon resonance というテクノロジーを使って反応速度論的に検討した。このテクノロジーはデキストランポリマー上に mAb 3221 を固相化した後、精製した sGC 溶液を一定速度

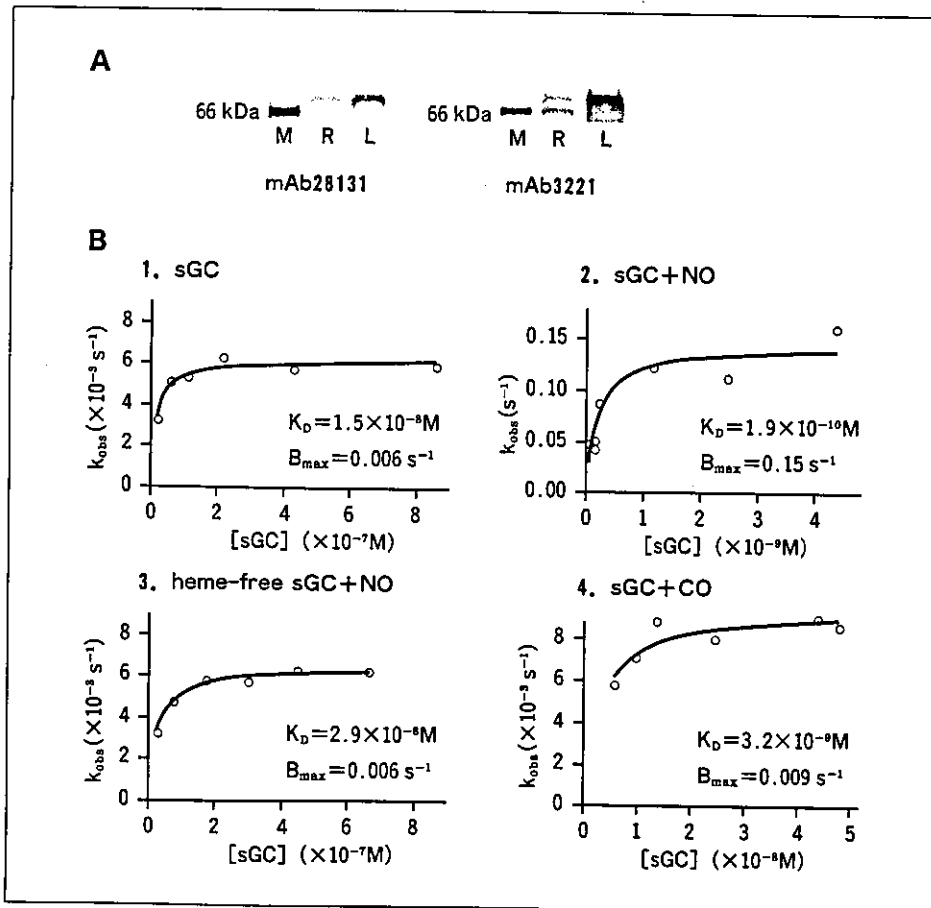


図 2. 抗 sGC 単クローン抗体の性質

A: ラット網膜可溶性画分のウェスタンブロット解析。
 B: Surface plasmon resonance による sGC 精製標品と mAb3221 の相互作用。mAb3221 と sGC の解離平衡定数(K_D)は、NO の存在下では二桁減少した。mAb3221 は酵素の活性化の度合いに応じて、その affinity が変化する性質を持つ抗 sGC 単クローン抗体である。
 (文献 14 より引用)

で流し、センサーと液相のインターフェイスで起きている屈折率の変化をリアルタイムで測定する。その変化が抗体に結合したsGCの質量に比例するという原理に基づいて、結合や解離の相互作用の指標となる反応速度定数を算定することが可能である。mAb3221とsGCの解離平衡定数(K_D)は、定常状態では $1.5 \times 10^{-8} M$ であったが、NOの存在下では二桁減少し $1.5 \times 10^{-10} M$ 、またCOの存在下では $3.2 \times 10^{-9} M$ と減少した¹⁵⁾。これは、mAb3221のsGCに対するaffinityがNO、COの存在下でそれぞれ約100倍、約10倍に上昇したことを意味する。興味深いことに、ヘムフリーの酵素を用いるとNOを添加しても K_D の減少はみられなかったことより、ヘムの存在がNOによるsGC活性化の必要条件であることが示唆された(図2B)¹⁴⁾。一方、mAb28131ではこのような K_D

の変化は全く認められない。換言すると、mAb3221はガス分子受容に伴うconformation変化を感知して結合力が変化する酵素活性化感知型であり、mAb28131は酵素活性化非感知型sGC抗体である。

3. 免疫組織化学的sGC活性化メカニスティックプロービング

前述した2種類の抗体を駆使すれば、生体内におけるsGCの活性化の状態とガス状メディエーターとの相互作用を定性的ではあるが視覚化できると考えた。そこで、脳神経組織のモデルとして、組織を構成する細胞種が同定しやすいラット網膜を用いた免疫染色標本を作成し、染色性の定量的解析を行うことで、*in situ*の系では捉えにくかったセンサー蛋白とシグナル分子の相互作用を直接的に標識するための

sGC活性化メカニスティックプロービングを試みた。図3は、CO産生系を修飾する目的で、ラット網膜に非常に強い可視光を24時間照射し、誘導型のCO産生酵素であるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)を誘導した時の、酵素活性化感知型抗体mAb3221による免疫染色像である。可視光照射によりHO-1は網膜全層にわたって発現し、ガス状メディエーター依存性のsGC活性能の変化が、*in situ*で空間的かつ定量的に捉えられていることが示されている。網膜の異なる細胞層ごとに、このような染色性の変化はmAb28131では全くみられなかった。

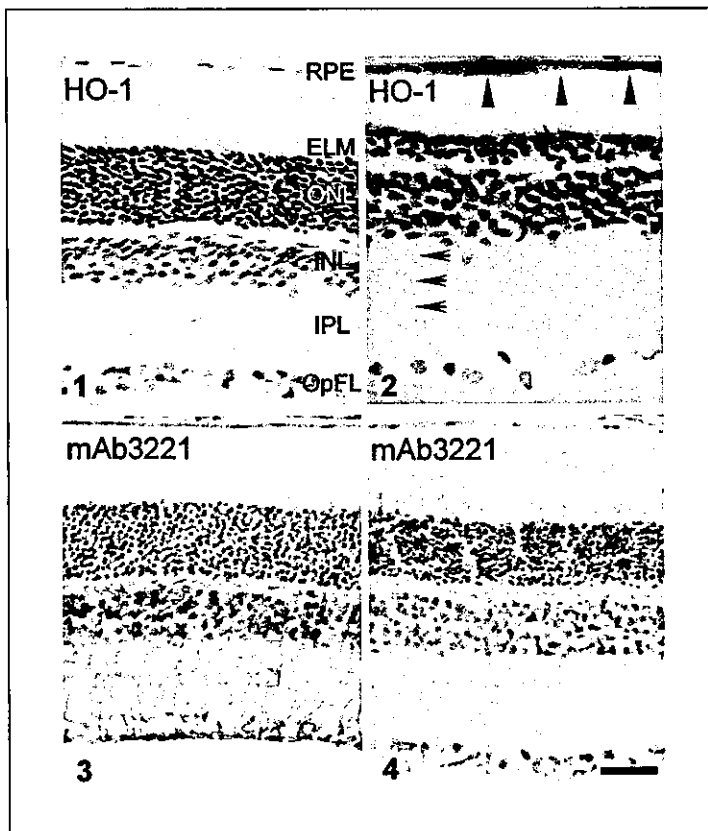


図3. HO-1の誘導に伴うsGC活性の変化
ラット網膜の抗HO-1単クローン抗体による免疫染色像(1:コントロール, 2:可視光照射24時間後)、酵素活性化感知型抗体mAb3221による免疫染色像(3:コントロール, 4:可視光照射24時間後)。RPE:色素上皮, ELM:外境界膜, ONL:外顆粒層, INL:内顆粒層, IPL:内網状層, OpFL:視神経線維層。Bar: 30 μm 。(文献14より引用)

興味深いことに、COの過剰産生によるsGC活性化に及ぼす効果は、網膜の各細胞層で異なっていた。外境界膜(external limiting membrane; ELM)では、CO生成系をupregulateするとsGC活性の上昇がみられた¹⁴⁾。逆に、内顆粒層(inner nuclear layer; INL)と内網状層(inner plexiform layer; IPL)ではsGC活性は減少した。このような網膜各細胞層間でのCO過剰生成に対するheterogenousな反応性のメカニズムについては後(6.)で考察する。

4. COによるNO依存性sGC活性化制御機構の

二面性：in vitroでの検証

前(3.)で述べたような、COによるNO依存性sGC活性の抑制効果が、in vitroの実験系で起こるか否かを検討した。ウシ肺から精製したsGC精製標品を用い、CO存在下・非存在下でNOドナーであるS-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)によるsGC活性を測定した。驚いたことに、反応溶液中にCO(10~30 μM)が存在すると、SNAPの濃度が低い範囲ではsGC活性は促進され、逆にSNAPの濃度が高い範囲では抑制された¹⁴⁾。このデータは、COがNOによるsGC活性化の行き過ぎを抑制する一方、NOの低い状況下では、sGC活性化を介して基礎cGMP

量を確保するためのアゴニストとして働く可能性を示唆するものである。図4にこの仮説をシェーマとして示した¹⁶⁾。

5. 網膜内でのCO・NOの生成・受容系

ラット網膜組織内でのNO・COの産生部位およびsGCの局在を免疫組織学的に検討した。NOの生成系としては、nNOSが少数のアマクリン細胞に、eNOSが比較的サイズの大きい微小血管内皮細胞に局在する。一方、CO産生酵素であるHO-2が、網膜の主要グリアであり支持細胞であるMüller'sグリア(MG)細胞に恒常的に高発現していることが判明した¹⁴⁾。また、強度の可視光線に長時間(24時間)露光された網膜組織では、ストレス蛋白であるHO-1がMG細胞に誘導される。NO・COのセンサー蛋白であるsGCは、MG細胞とon-type双極細胞に発現が認められた¹⁴⁾。図5に、網膜内でのNO・COの生成・受容系の関係をまとめた。MG細胞で生成されるCOは、ストレス感知下のみならず定常状態においてもsGC活性を精密に制御していると考えられる。また、その制御の範囲はMG細胞内のみならず、隣接する細胞にまで及ぶ知見が得られ、COによるsGC活性の修飾は、オートクリンかつパラクリン的に起こることが示唆さ

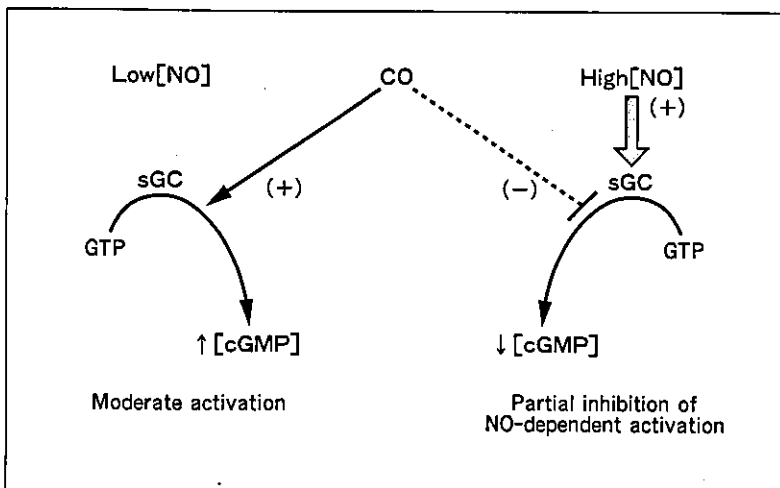


図4. COによるsGC活性化制御機構の二面性

COはNO依存性のsGC活性を促進したり、逆に阻害する効果を持つ。この二面性は、NOの局所の濃度によって規定されることが考えられる。

(文献16より引用)

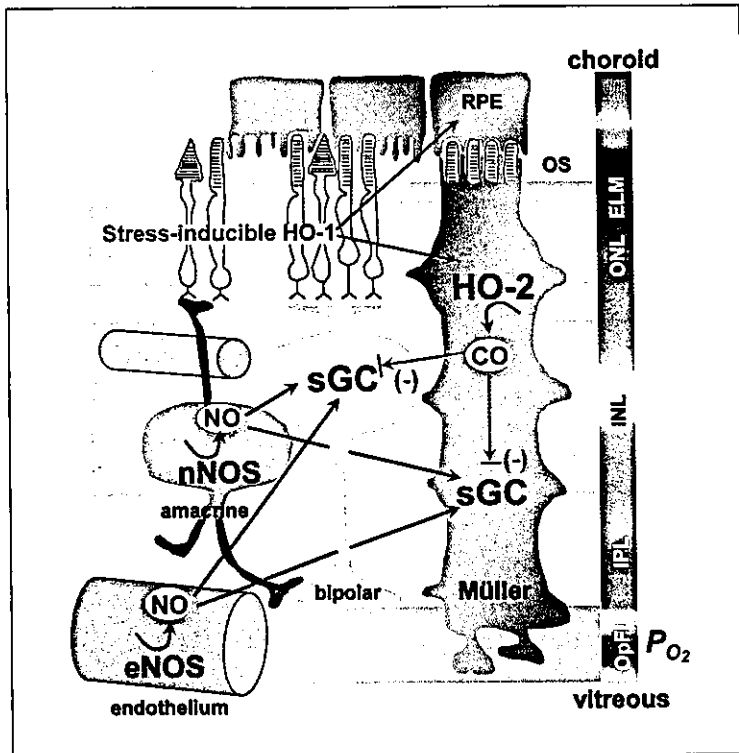


図5. ラット網膜組織におけるNO, CO生成酵素と受容体蛋白, sGCの関係

sGC活性化はNOによって制御されているが, Müller's グリア細胞で産生される内因性のCOによって, さらに精密な制御を受けている。(文献14より引用)

のメカニズムを説明するための鍵となるのが, 局所のNO availabilityである。ELMはNO生成系から遠い位置にあることから, NO availabilityは低いと考えられる。反して, INLやIPLでの非常に低い酸素分圧(P_{O_2})¹⁷⁾はNOのhalf-lifeを長くし, またこれらの層はeNOS, nNOS由来のNO生成系に近いことから, 高いNO availabilityを保持できると推察される。そこで次のような仮説が考えられる。「COはNO依存性sGC活性化を一面的に調節しているのではなく, 網膜の層特異的にNO濃度の低い層(ELM)ではアゴニストとして, 逆にNO濃度の高い層(INL, IPL)ではCOがpartial antagonistとして作用する」。前(4.)で述べた, *in vitro*の実験から示唆されたCOによるNO依存性sGC活性化制御機構の二面性(図4)は, この仮説を支持するものである。

おわりに

れた。

6. 層特異的制御

ラット網膜という組織学的に層を構成する細胞種が同定しやすい実験系の選択がもたらした最大のメリットは, シグナル分子であるCO・NOとそのセンサー蛋白のsGCの相互作用が, 一組織内であるにもかかわらず, 一面的でなく多面的に捉えられたことである。具体的には, 前(3.)で述べたCOの過剰生成によるheterogeneousで層特異的なsGC活性化の変化である。つまりELMでは, 内因性のCO産生によってsGC活性は増強されるが, 一方, INLとIPLでは減弱された。

このようなCOに対するheterogeneousな反応性

では, 「なぜNOのみならずCOが必要なのか」という疑問に対してであるが, 次のような答えが考えられる。まず, sGCの活性化能は低いながら, COという安定な非ラジカル分子でcGMP量を調節することが, NOという反応性の高いラジカル分子での制御より適した組織部位の存在を挙げる。網膜photoreceptor outer segmentは, phototransductionの最初のステップであるlight absorptionを司るロドプシンで満たされており, このpigmentはレチナールというラジカル分子による酸化を非常に受けやすい分子を構成要素として持つ。つまり, この層で高濃度のNOが存在した場合, レチナールの分解を促進する可能性があるため, COがより望ましい制御分子であるといえる。このような意味でのCOの活用がなされて

いる他の臓器としては、精巣や肝臓が挙げられる。精巣では、ストレッサー曝露下に起こる一連の spermatogenic control は CO によって制御され¹⁸⁾、また肝臓では、CO によって低い血管抵抗を維持することで豊富な血流が確保されることが解明されている¹⁹⁾²⁰⁾。前者では DNA が、後者ではビタミン A が貯蔵されており、これらはレチナール同様ラジカル分子による分解・修飾を受けやすい分子である。

最後に、ガス分子生成系とその受容体蛋白質の生体内局在を明らかにし、ガス分子を *in situ* で、さらにガスシグナリングを受容体である sGC の活性化を output としてイメージングする技術を展開させたことによって、これまで論ずることが困難であった複数のガス分子による受容体蛋白質の機能調節機構を解明する出発点に立てたと考える。

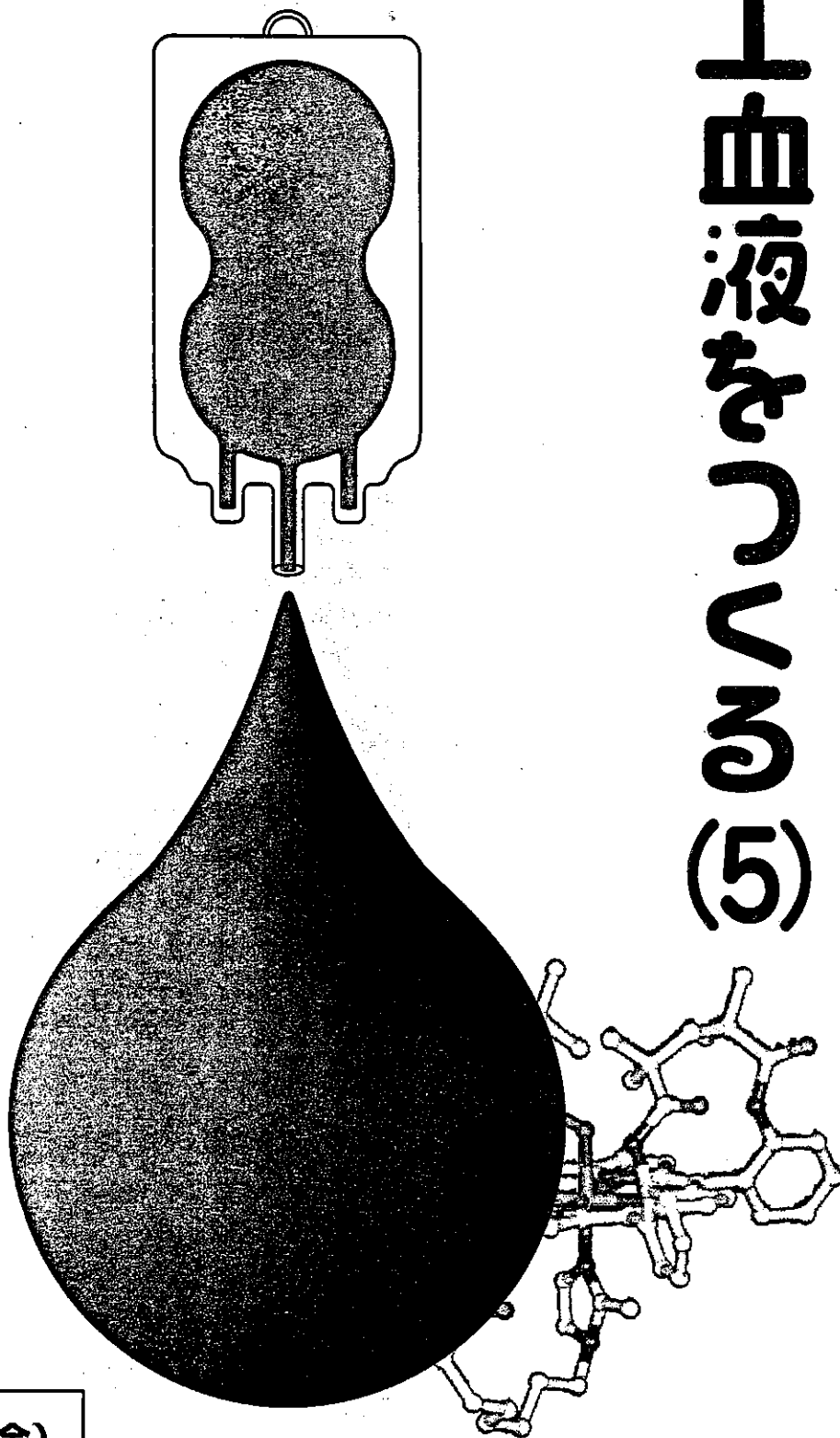
◎文献

- 1) Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, et al : Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100 : 2793-2799, 1997
- 2) Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Suematsu M : Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules : alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein. *Circ Res* 91 : e55-e64, 2002
- 3) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al : Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators : diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70 : 2446-2453, 1998
- 4) Kavdia M, Popel AS : Contribution of nNOS and eNOS derived NO to microvascular smooth muscle NO exposure. *J Appl Physiol* 2004 Mar 19[Epub ahead of print]
- 5) Denninger JW, Marletta MA : Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411 : 334-350, 1999
- 6) Ignarro LJ : Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. *Adv Pharmacol* 26 : 35-65, 1994
- 7) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 8) Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA : Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37 : 4502-4509, 1998
- 9) Makino R, Matsuda H, Hori H, et al : EPR characterization of axial bond in metal center of native and cobalt-substituted guanylate cyclase. *J Biol Chem* 274 : 7714-7723, 1999
- 10) Stone JR, Marletta MA : Soluble guanylate cyclase from bovine lung : activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33 : 5636-5640, 1994
- 11) Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA : A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 14753-14758, 1999
- 12) Koesling D, Friebe A : Soluble guanylyl cyclase : structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135 : 41-65, 1999
- 13) Sharma VS, Magde D : Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide : a mechanistic model. *Methods* 19 : 494-505, 1999
- 14) Kajimura M, Shimoyama M, Suematsu M, et al : Visualization of gaseous monoxide sensing by soluble guanylate cyclase in rat retina. *FASEB J* 17 : 506-508, 2003
- 15) Tsuyama S, Yamazaki E, Tomita T, et al : Characterization of a novel monoclonal antibody that senses nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* 455 : 291-294, 1999
- 16) Kajimura M, Goda N, Suematsu M : Organ design for generation and reception of CO : lessons from the liver. *Antioxid Redox Signal* 4 : 633-637, 2002
- 17) 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
- 18) Ozawa N, Goda N, Makino N, et al : Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* 109 : 457-467, 2002
- 19) Suematsu M, Goda N, Ishimura Y, et al : Carbon monoxide : an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96 : 2431-2437, 1995
- 20) Suematsu M, Ishimura Y : The heme oxygenase-carbon monoxide system : a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 31 : 3-6, 2000

その他

平成16年度 研究成果発表会

人工血液をこころ(5)

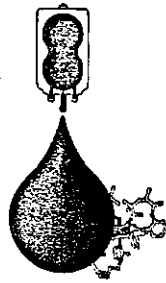


平成17年2月11日(金)

時間: 13:00~17:00

慶應義塾大学 医学部 北里講堂

主 催・厚生労働省科学研究班
・財団法人 日本公定書協会
後 援: 日本血液代替物学会



ご挨拶

このたびは厚生労働省科学研究・医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業の平成16年度研究成果発表会「人工血液をつくる(5)」にご参加を頂きまして有難うございます。

20世紀には輸血による治療が確立し、多くの人々が輸血治療の恩恵に浴することができるようになりました。また、輸血治療によって引き起こされる望ましくない副作用や合併症についても理解が深まり、輸血治療は安全な方法になってまいりました。

血液を介して起こる感染症はかなり解明されてまいりましたが、現在でも新しいウイルスやプリオン病に関してはまだ十分に解明されているとはいえない状態にあります。

また、少子高齢化という社会構造の変化に伴い献血による血液の供給が減少し、高齢者において使用が増加する傾向は今後も続いてゆくと考えられています。

このような状況で、輸血を補完する治療法として考えられているのが人工血液です。

人工赤血球では血液型に関係なく、室温で保存が可能で、感染症の危険性のない物質を目指して研究開発を進めており、現在、臨床応用が可能であると考えられる候補物質が開発されています。人工赤血球は、外傷や手術時の輸血代替に使用するだけでなく、粒径が小さいことを利用して、癌や虚血性疾患の治療にも利用できると考えられています。

人工血小板では血小板が少なくなって止血に異常が起こった時に減少した血小板の役割を果たす物質です。

人工抗体は感染症に対する治療に用いるため研究が進んでいますが、免疫治療の一環として悪性腫瘍に使用できるようになる可能性も研究されています。

また、胚性幹細胞を用いて赤血球や血小板、抗体などを試験管の中で製造することについても最近研究に進展が見られてきました。

本日は以上のような研究の結果について9人の先生方から研究成果を発表していただき、発表を通じて血液の機能、人工血液の必要性、開発状況などについてご理解を深めていただければ幸いです。

慶應義塾大学 医学部 外科
小林 紘一