

# ラット網膜における心房性ナトリウム利尿ペプチド, C型ナトリウム利尿ペプチドおよび一酸化窒素による cGMP の生成について

森脇 裕平<sup>1)</sup>, 上崎 善規<sup>2)</sup>, 伊藤 忠雄<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>鳥取大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>鳥取大学医学部臨床薬理学教室

## 要 約

ラット網膜における心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP), C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) および一酸化窒素 (NO) による cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 生成経路について検討した。ANP ( $10^{-7}$  M), CNP ( $10^{-7}$  M), NO ドナーである S-nitroso-N-acetylpenicillamine ( $10^{-5}$  M, SNAP), A 23187 ( $10^{-5}$  M;  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore), carbachol ( $10^{-3}$  M) を作用させた場合, 網膜の cGMP 量は 1.45~1.67 倍 ( $p < 0.01$ ) に上昇した。A 23187 作用による cGMP 量上昇は, NO 消去薬である carboxy-PTIO ( $10^{-3}$  M) で抑制された。Carbachol による cGMP 量上昇は, carboxy-PTIO ( $10^{-3}$  M), NO

合成酵素阻害薬である  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine ( $10^{-3}$  M, L-NNA), atropine ( $10^{-5}$  M) で抑制された。以上のことから, 網膜の cGMP 生成経路には ANP-, CNP-, NO-cGMP 経路の 3 経路が存在し, NO-cGMP 経路はアセチルコリンムスカリン受容体により賦活されることが示唆された。(日眼会誌 100: 187-191, 1996)

キーワード: 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP), C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP), 一酸化窒素 (NO), cGMP, 網膜

## cGMP Synthesis Induced by Atrial Natriuretic Peptide, C-Type Natriuretic Peptide, and Nitric Oxide in the Rat Retina

Yuhei Moriwaki<sup>1)</sup>, Yoshinori Kamisaki<sup>2)</sup> and Tadao Itoh<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University

<sup>2)</sup>Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Tottori University

### Abstract

This study was undertaken to determine whether atrial natriuretic peptide (ANP)-, C-type natriuretic peptide (CNP)-, and nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathways exist in the rat retina. Exposure of the retina to ANP ( $10^{-7}$  M), CNP ( $10^{-7}$  M), S-nitroso-N-acetylpenicillamine ( $10^{-5}$  M, SNAP; a NO donor), A23187 ( $10^{-5}$  M; a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore), and carbachol ( $10^{-5}$  M) caused 1.45~1.67-fold increases in cGMP content ( $p < 0.01$ ). Carboxy-PTIO ( $10^{-3}$  M; a NO scavenger) blocked the increase in cGMP induced by A23187. Both carboxy-PTIO ( $10^{-3}$  M) and  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine ( $10^{-3}$  M, L-NNA; a NO inhibitor) blocked

the increase in cGMP induced by carbachol. Atropine ( $10^{-5}$  M; a muscarinic receptor antagonist) also blocked the cGMP increase induced by carbachol. These data demonstrate that ANP-, CNP- and NO-cGMP pathways exist in the retina and that the NO-cGMP pathway may be linked to the activation of the muscarinic receptor. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 187-191, 1996)

Key words: Atrial natriuretic peptide (ANP), C-type natriuretic peptide (CNP), Nitric oxide (NO), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), Retina

## I 緒 言

cyclic guanosine monophosphate (cGMP) はほとん

どの動物に広く分布し, 腎臓および腸管のイオン輸送, 細胞内へのカルシウム輸送を通じて血小板凝集, 心筋および平滑筋の収縮, また中枢神経系におけるその活動の制

別刷請求先: 683 鳥取県米子市西町 86 鳥取大学医学部眼科学教室 森脇 裕平

(平成7年8月15日受付, 平成7年10月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yuhei Moriwaki, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago-shi, Tottori-ken 683, Japan

(Received August 15, 1995 and accepted in revised form October 6, 1995)

御など様々な生体反応に関与している<sup>1)</sup>。この cGMP はグアニル酸シクラーゼ(GC)により生成される。GCは、構造および細胞内局在から、現在、膜型と可溶型に分けられている。膜型 GC としては GC-A, GC-B, GC-C, そして retinal GC (retGC) が存在し、それぞれを活性化する物質として GC-A に対しては心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と脳型ナトリウム利尿ペプチド (BNP), GC-B には C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP), GC-C には heat-stable enterotoxines と guanylin が知られている。また, retGC は retinal cyclase regulator により活性化される。一方, 可溶型 GC (sGC) は一酸化窒素 (NO) により活性化される<sup>1)~5)</sup>。

これまで、網膜では、主に光受容体である視細胞杆体外筋における retGC による cGMP の生成とそれによる Na イオンチャンネルの制御に関する研究が主である<sup>6)~8)</sup>。しかし、その他の GC による cGMP 生成に関する研究はまだあまり行われておらず、今回、著者らはラットの網膜を用いて、GC-A, GC-B および sGC を介した cGMP 生成系に関する検討を ANP, CNP および NO 関連薬を用いて行った。

## II 実験方法

12 時間の light-dark サイクル (light : 約 500 lux の室内光) で飼育した 8 週齢の Wister 系雄ラットを使用した。Dark サイクル終了の 3~4 時間後 (午前 10~11 時) に室内光下で、総理府「実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月) に基づく「鳥取大学医学部実験動物指針」(昭和 63 年 12 月) に従って頸椎離断し、ただちに眼球を摘出した後、網膜を剝離摘出し、Krebs 液 (NaCl, 135 mmol/L; KCl, 4.8 mmol/L; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 mmol/L; glucose, 10.0 mmol/L; HEPES, 12.5 mmol/L; pH 7.5) で 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 下 37°C で 60 分間インキュベーションした。次に、同様の Krebs 液に ANP (10<sup>-7</sup>M), CNP (10<sup>-7</sup>M), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (10<sup>-5</sup>M, SNAP), A 23187 (10<sup>-5</sup>M, Ca<sup>2+</sup> ionophore), N-methyl-D-aspartate (10<sup>-3</sup>M, NMDA), carbachol (10<sup>-3</sup>M) をそれぞれ単独に加えて、30 秒, 1 分, 2 分, 5 分間インキュベーションした後, trichloroacetic acid (final 5%) を加えて反応を止めた。NO 関連薬による cGMP 上昇作用に対する阻害実験の場合, carboxy-PTIO (10<sup>-3</sup>M), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (10<sup>-3</sup>M, L-NNA) または atropine (10<sup>-5</sup>M) で 10 分間前処置した。反応後の網膜中の cGMP 量は Amersham 社 (Amersham) 製の EIA キットを用いて測定し、蛋白量は Lowry 法<sup>9)</sup>の方法を用いて測定した。ANP および CNP (ペプチド研究所), SNAP および carboxy-PTIO (同仁化学研究所), L-NNA (フナコシ) 以外はすべて、和光純薬製の薬物を使用した。それぞれの試薬の濃度は、同じ薬物を用いた研究報告<sup>4)5)10)~12)</sup>に従った。

統計処理は ANOVA 検定を行った後、Scheffe の多重比較検定を行い、有意水準は 5% とした。

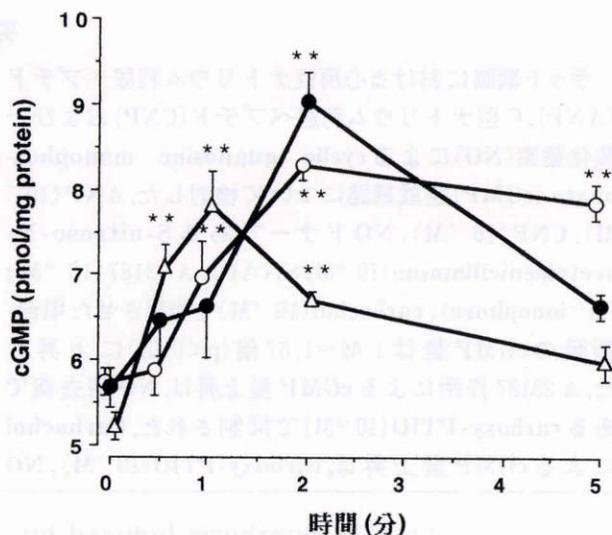


図 1 ラット網膜に ANP (10<sup>-7</sup>M), CNP (10<sup>-7</sup>M), SNAP (10<sup>-5</sup>M) を作用させた場合の cGMP 量の経時変化。

○ : ANP, ● : CNP, △ : SNAP. 値は平均値 ± 標準誤差 (n=4~6) を示す. \*\* : p<0.01 [対照 (0 分) との有差].

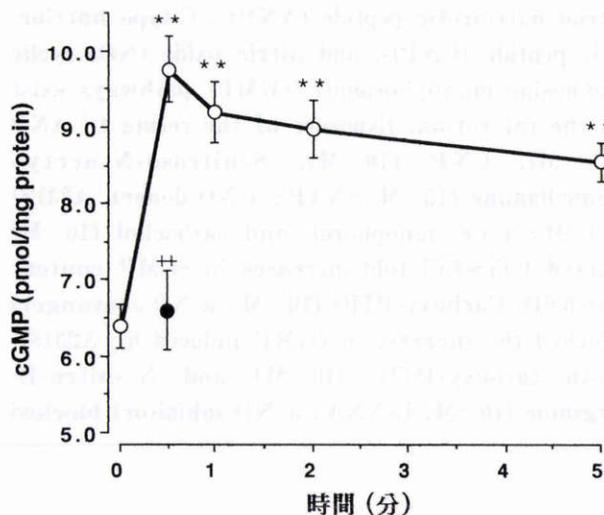


図 2 ラット網膜に A 23187 (10<sup>-5</sup>M) を作用させた場合の cGMP 量の経時変化と A 23187 (10<sup>-5</sup>M) の cGMP 量上昇作用に対する carboxy-PTIO (10<sup>-3</sup>M) の阻害効果。

○ : A 23187, ● : A 23187 + carboxy-PTIO. Carboxy-PTIO の前処置時間 : 10 分間. 値は平均値 ± 標準誤差 (n=5) を示す. \*\* : p<0.01 [対照 (0 分) との有差], + : p<0.01 [A 23187 単独作用 (30 秒) との有差].

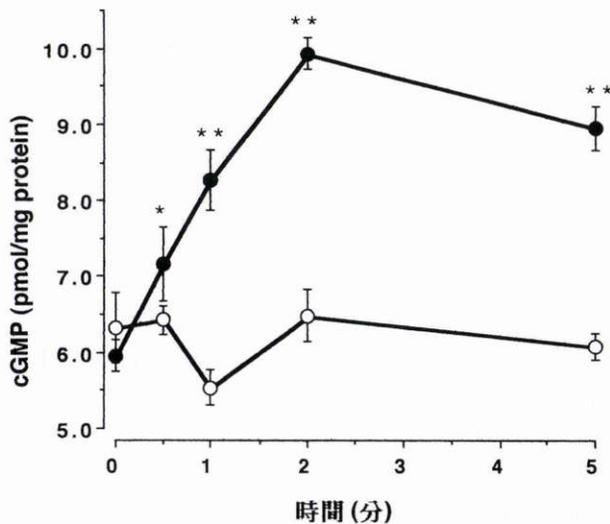


図 3 ラット網膜に NMDA ( $10^{-3}M$ ), carbachol ( $10^{-3}M$ ) を作用させた場合の cGMP 量の経時的変化。  
○: NMDA, ●: carbachol. 値は平均値±標準偏差 (n=5) を示す. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  [対照 (0 分) との有意差].

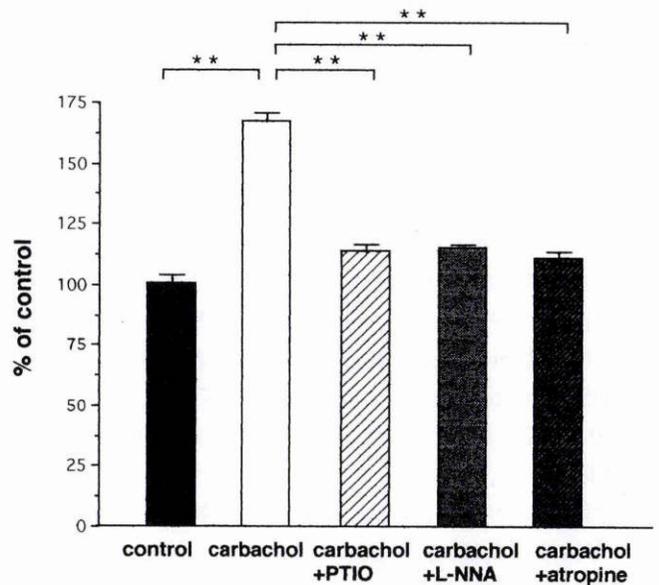


図 4 Carbachol ( $10^{-3}M$ ) の cGMP 量上昇作用に対する carboxy-PTIO ( $10^{-3}M$ ), L-NNA ( $10^{-3}M$ ), atropine ( $10^{-5}M$ ) の阻害効果。  
Carbachol の作用時間: 2 分間, Carboxy-PTIO, L-NNA, atropine の前処置時間: 10 分間. 値は平均値±標準偏差 (n=5) を示す. \*\*:  $p < 0.01$ .

### III 結 果

#### 1. ラット網膜における ANP, CNP, SNAP の cGMP 量上昇作用

図 1 は, ラット網膜に ANP ( $10^{-7}M$ ), CNP ( $10^{-7}M$ ), SNAP ( $10^{-5}M$ ) を作用させた場合の cGMP 量の経時変化を示す (n=4~6). ANP により cGMP 量は反応開始後 1 分から有意に上昇し 2 分でピークに達し, 対照 (0 分) の 1.45 倍となった. この上昇は 5 分まで有意であった ( $p < 0.01$ ). CNP を作用させた場合は反応開始後 2 分でピークを成し, 対照の 1.59 倍となった ( $p < 0.01$ ). NO ドナーである SNAP ( $10^{-5}M$ ) を作用させた場合は反応開始後 30 秒から 2 分まで有意な上昇を示し ( $p < 0.01$ ), 反応開始後 1 分では対照の 1.50 倍に達した.

#### 2. ラット網膜における A 23187 ( $Ca^{2+}$ ionophore) の cGMP 量上昇作用とその NO 関与について

図 2 は, A 23187 ( $10^{-5}M$ ) を作用させた場合の cGMP 量の経時変化と A 23187 ( $10^{-5}M$ ) の cGMP 量上昇作用に対する carboxy-PTIO ( $10^{-3}M$ ) の阻害効果を示す (n=5). A 23187 作用後 30 秒でピークに達し対照の 1.53 倍となり, 5 分まで有意な上昇を示した ( $p < 0.01$ ). A 23187 を 30 秒間作用させた場合の cGMP 量上昇は, NO 消去剤である carboxy-PTIO により有意に阻害された ( $p < 0.01$ ).

#### 3. ラット網膜における NMDA, carbachol の cGMP 量上昇作用

図 3 は, NMDA ( $10^{-3}M$ ) および carbachol ( $10^{-3}M$ ) を作用させた場合の cGMP 量の経時変化を示す (n=5).

NMDA ( $10^{-3}M$ ) では, cGMP 量は有意な上昇を示さなかった. Carbachol ( $10^{-3}M$ ) では, 反応開始後 2 分でピークに達し対照の 1.67 倍となり, 5 分まで有意な上昇を示した ( $p < 0.01$ ).

#### 4. Carbachol 作用時の cGMP 量上昇への NO 関与について

図 4 は, carbachol ( $10^{-3}M$ ) の cGMP 量上昇作用に対する carboxy-PTIO ( $10^{-3}M$ ) の阻害効果 (n=5) を示す. Carbachol を 2 分間作用させた場合の cGMP 量上昇は NO 消去薬である carboxy-PTIO ( $10^{-3}M$ ), NO 合成阻害薬の L-NNA ( $10^{-3}M$ ) およびアセチルコリンムスカリン受容体拮抗薬の atropine ( $10^{-5}M$ ) により有意に阻害された ( $p < 0.01$ ).

### IV 考 按

GC は生体内において cGMP を生成する酵素であり, これまでに GC-A, GC-B, GC-C, retGC および sGC が知られている. ラットの網膜における GC の存在に関しては, 1993 年に Ahmad<sup>13)</sup> が, in situ hybridization 法により GC-A がラット網膜視細胞杆体に存在し, sGC は網膜全層に認められ, 特に内顆粒層に存在していることを報告している. また, 生理学的研究では, sGC が双極細胞に存在していることも報告<sup>14)</sup> されている. GC-B に関しては, 発現クローニングによりヒト網膜において, その存在が認められている<sup>15)</sup> が, ラット網膜では不明である. 今回, 著者らの研究では, ラット網膜に ANP, CNP および NO ドナーである SNAP を作用させ, 網膜内神経伝達系

が維持されている状態で cGMP 量の経時変化を調べた。ANP ( $10^{-7}$ M), CNP ( $10^{-7}$ M), SNAP ( $10^{-5}$ M) を網膜に作用させた場合、有意な cGMP 量の上昇が得られた。これにより網膜の cGMP 生成経路には、retGC による経路以外に、ANP-, CNP-, NO-cGMP 経路の 3 経路も存在することが示唆された。このことと前記の GC の局在研究とを合わせて考えると、網膜には cGMP 生成経路として網膜全層、特に内顆粒層を中心とした NO-cGMP 生成経路と視細胞杆体を中心とした ANP-cGMP 生成経路が存在するものと考えられる。GC-B の局在に関する組織学的検討がないため、今回著者らの研究が示唆した CNP-cGMP 生成経路が網膜のどの部位に存在するのかわかりません。

生体内において、NO は NO 合成酵素により産生され、平滑筋の弛緩、血小板凝集阻害、マクロファージや好中球の細胞毒性、神経情報伝達など多彩な役割を演じている。特に、中枢神経系における NO-cGMP 経路に関する研究では 1988 年の Garthwaite ら<sup>10)</sup>による小脳の培養細胞における研究以降、グルタミン酸が小脳の NO 産生細胞の NMDA 受容体に結合すると、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入に伴い細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、この  $Ca^{2+}$  により構成型 NO 合成酵素が活性化され、L-arginine を基質として NO を産生し、この NO が拡散により標的細胞内の sGC に作用し cGMP を生成するという NO-cGMP 経路が小脳に存在することが報告<sup>10)11)</sup>されている。しかし、網膜における NO 産生についてはあまり研究がなされておらず、どのような刺激により NO が発生するのかは現在のところ不明である。そこで、著者らは小脳の NO 研究を基に、まず網膜に対し A 23187 ( $10^{-5}$ M) を作用させ細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を強制的に上昇させたところ、有意な網膜内 cGMP 量上昇を認めた。この上昇は、NO 消去剤である carboxy-PTIO ( $10^{-3}$ M) により有意に抑制された。このことは網膜においても、小脳およびその他の組織と同様に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇により NO 産生が起これ、この NO により cGMP 生成を促進する経路が存在することを示唆している。次に、小脳と同様に網膜でも NMDA により cGMP 量上昇が起こるのかを検討したが、網膜においては NMDA ( $10^{-3}$ M) 刺激で cGMP 量は上昇しなかった。そこで、大脳皮質において carbachol により cGMP 量上昇が起こることが報告<sup>12)</sup>されているので、carbachol ( $10^{-3}$ M) を作用させたところ、網膜において有意な cGMP 量の上昇が認められた。さらに、この cGMP 量上昇は、NO 消去薬 carboxy-PTIO ( $10^{-3}$ M) および NO 合成酵素阻害薬 L-NNA ( $10^{-3}$ M) により有意に抑制された。このことにより、網膜においては carbachol 作動性に構成型 NO 合成酵素が活性化され、これにより NO が発生し cGMP 量の上昇を引き起こすことを示している。さらに、carbachol による cGMP 量上昇はアセチルコリンムスカリン受容体拮抗薬の atropine ( $10^{-5}$ M)

により阻害されたので、この NO-cGMP 生成経路はアセチルコリンムスカリン受容体により賦活されると考えられる。

ここでの NO 産生系が網膜のどの部位に存在するかを検討するために、これまでの研究報告を調べた。網膜における構成型 NO 合成酵素の局在に関する研究では、1985 年に Sandell<sup>17)</sup>がラット、ウサギ、ネコ、サル、そしてヒト網膜を組織化学的に調べ、NADPH diaphorase 陽性細胞が網膜内顆粒層に認められることを報告し、その後、ウサギ網膜内顆粒層のアマクリン細胞に NADPH diaphorase 陽性細胞が存在することが報告<sup>18)19)</sup>されている。また、NO 合成酵素に対する抗体を用いた免疫組織化学的方法を用いて、1994 年に Yamamoto ら<sup>20)</sup>がラット網膜内顆粒層内層のアマクリン細胞と神経節細胞層に散在性に認められる異所性のアマクリン細胞に NO 合成酵素が認められ、水平細胞の一部にも認められたと報告している。したがって、著者らの研究により、網膜にアセチルコリンムスカリン受容体を介した NO 産生系の存在が示唆されたこと、およびアマクリン細胞にはアセチルコリンムスカリン受容体が存在することがこれまでに報告<sup>21)22)</sup>されていることを考え合わせると、網膜ではアマクリン細胞のアセチルコリンムスカリン受容体の刺激により NO 産生が促進されると考えられる。

また、網膜にフリッカー刺激を行った場合にアセチルコリンが放出されることや、光刺激により NADPH diaphorase 陽性アマクリン細胞が刺激されるとの報告<sup>23)</sup>がある。したがって、光刺激に基づきアセチルコリンが放出され、これがアセチルコリンムスカリン受容体を有するアマクリン細胞に作用し、同細胞における NO 産生を促進し、この NO が双極細胞などに存在する sGC を活性化し、cGMP 量を上昇させるという経路が存在する可能性が考えられる。

以上をまとめると、今回ラット網膜を使用しての実験結果により、網膜の cGMP 生成経路には retGC による経路以外に ANP-, CNP-, NO-cGMP 経路の 3 経路が存在すること、さらにアセチルコリンムスカリン受容体の刺激により NO 産生、cGMP 上昇が促進されることが示唆された。

御助言、御校閲を賜りました本学眼科学教室の玉井嗣彦教授に深謝いたします。

本稿の要旨は、第 99 回日本眼科学会総会において報告した。

## 文 献

- 1) Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U: The nitric oxide and cGMP signal transduction system: Regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175, 1993.
- 2) Wong SK-F, Garbers DL: Receptor guanylyl cyclases. *J Clin Invest* 90: 299-305, 1992.

- 3) **Garbers DL, Lowe DG**: Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269: 30741—30744, 1994.
- 4) **Waldman SA, Rapoport RM, Murad F**: Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* 259: 14332—14334, 1984.
- 5) **Hernández F, Alexander SPH, Kendall DA**: Natriuretic peptide-induced cyclic GMP accumulation in adult guinea-pig cerebellar slices. *Br J Pharmacol* 113: 216—220, 1994.
- 6) **Koch K-W, Stryer L**: Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* 334: 64—66, 1988.
- 7) **Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, et al**: Recoverin: A calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251: 915—918, 1991.
- 8) **Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gillett NA, Goeddel DV, Lowe DG**: Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron* 9: 727—737, 1992.
- 9) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 10) **Bredt DS, Snyder SH**: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030—9033, 1989.
- 11) **Kiedrowski L, Costa E, Wroblewski JT**: Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 58: 335—341, 1992.
- 12) **Castoldi AF, Manzo L, Costa LG**: Cyclic GMP formation induced by muscarinic receptors is mediated by nitric oxide synthesis in rat cortical primary cultures. *Brain Res* 610: 57—61, 1993.
- 13) **Ahmad I, Barnstable CJ**: Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. *Exp Eye Res* 56: 51—62, 1993.
- 14) **Shiells R, Falk G**: Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *Neuroreport* 3: 845—848, 1992.
- 15) **Duda T, Goraczniak RM, Sitaramayya A, Sharma RK**: Cloning and expression of an ATP-regulated human retina C-type natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Biochemistry* 32: 1391—1395, 1993.
- 16) **Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R**: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385—388, 1988.
- 17) **Sandell JH**: NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J Comp Neurol* 238: 466—472, 1985.
- 18) **Sagar SM**: NADPH diaphorase histochemistry in the rabbit retina. *Brain Res* 373: 153—158, 1986.
- 19) **Osborne NN, Barnett NL, Herrera AJ**: NADPH diaphorase localization and nitric oxide synthetase activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Res* 610: 194—198, 1993.
- 20) **Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone RA**: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189—200, 1993.
- 21) **Bonaventure N, Jardon B, Sahel J, Wioland N, Roussel G**: Acetylcholine in the frog retina: Physiological and histological data of the muscarinic and nicotinic system. In: Agardh E, et al (Eds): *Retinal Signal Systems, Degenerations and Transplants*. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), New York, 47—51, 1986.
- 22) **Neal MJ, Cunningham JR**: Baclofen enhancement of acetylcholine release from amacrine cells in the rabbit retina by reduction or glycinergic inhibition. *J Physiol* 482: 363—372, 1995.
- 23) **Koistinaho J, Swanson RA, de Vente J, Sagar SM**: NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: Putative target cells and stimulation by light. *Neuroscience* 57: 587—597, 1993.