

第 104 回 日本眼科学会総会 特別講演Ⅱ

遺伝子発現と眼の発生・生理・病理

松田 英彦

北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座

共同研究者

吉田 和彦, 原田 高幸, 原田知加子, 大木 一隆, 西堀 宗樹

(北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座)

酒井 正春, 西 信三 (北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座)

今城 純子 (日本医科大学解剖学第一講座)

萩原 正敏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野)

田中 光一 (東京医科歯科大学難治疾患研究所分子神経科学)

和田 圭司 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部)

Michael Karin, Yinling Hu (Department of Pharmacology, University of California, San Diego)

要 約

我々は眼における遺伝子発現とその意義を遺伝子欠失モデルの解析により検討してきた。ここではその概略を発生、生理、病理に分けて記述した。

発生では起源を同じくする眼瞼、結膜、角膜の上皮組織の分化と転写因子 NF- κ B, 水晶体の分化と maf 遺伝子 family の 2 つの実験系を検討した。

その結果は、特定遺伝子の欠失はその遺伝子の機能に応じた発生異常が表現されることを明瞭に示していた。

生理では光の on, off 刺激により早期発現遺伝子の一つである c-fos 遺伝子が網膜を構成する神経細胞においてそれぞれ異なる様式で発現すること、この発現に必要な情報伝達経路が網膜細胞に存在することが明らかになった。また、c-fos 遺伝子の発現は視覚に関与する種々の後期発現遺伝子の発現を誘導する可能性が推定された。

病理では外傷刺激でも光刺激と同様に網膜に c-fos 遺

伝子が発現するが、発現する細胞は Müller 細胞であることが示された。また、転写因子 c-Jun のリン酸化が網膜神経節細胞のアポトーシスに関与することが推定された。

一方、虚血時などに惹起されるグルタミン酸毒性に対しては、グルタミン酸トランスポーター GLAST, GLT-1 が網膜神経細胞の保護に重要な機能をもつことが示された。さらに、視細胞変性網膜においては、ニューロトロフィン受容体である trkC と p75 がそれぞれ視細胞保護あるいは視細胞障害に働くことが示された。(日眼会誌 104:858-874, 2000)

キーワード: 遺伝子発現, ノックアウトマウス, 細胞内情報伝達, グルタミン酸トランスポーター, ニューロトロフィン

A Review

Gene Expression and the Eye

Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

We examined the role of the expression of the various genes in ocular tissues using knockout mice.

In this paper, the results are described in three sections: development, physiology, and pathology.

別刷請求先: 060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座 松田 英彦
(平成 12 年 10 月 4 日受付, 平成 12 年 10 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Hidehiko Matsuda, M.D. Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Kita 15, Nishi 5, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

(Received October 4, 2000 and accepted in revised form October 11, 2000)

Regarding development, the IKK α in the development of the ocular surface and maf family genes in the development of the lens were examined. We clearly demonstrated that the deletion of some genes results in disorganization in the development according to the function of the genes.

Regarding physiology, c-fos gene was expressed in the subpopulation of retinal neurons under a physiological light/dark cycle, and its expression is dependent on signal transduction system in the retinal cells.

Regarding pathology, focal retinal injury of the retina induced the expression of c-fos mRNA in retinal Müller cells. There is a significant contribution of Jun N-terminal phosphorylation to the induction

of apoptosis of retinal ganglion cells after optic nerve transection. GLAST is required for normal signal transmission between photoreceptors and bipolar cells and both GLAST and GLT-1 play a neuroprotective role during ischemia in the retina. Blockage of the neurotrophin receptor p 75 rescue photoreceptor apoptosis induced by light exposure whereas the blockage of TrkC increased the photoreceptor cell death. (J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 858—874, 2000)

Key words : Gene expression, Knockout mice, Signal transduction, Glutamate transporter, Neurotrophin

I 緒 言

II 発 生

生物の生命活動が正常な遺伝子の発現によって営まれていることは知識として我々は知っている。しかし、遺伝子の発現ということを考えてみると、これは生体を構成する個々の細胞の中で起こっている現象である。ある刺激が細胞に到達すると、細胞内の情報伝達機構を通じて DNA にそれが伝わる。そして、DNA に組み込まれている遺伝子情報が mRNA に転写される。これが機能的な蛋白質を作る。この過程を遺伝子発現という。これは細胞の中で生じていることであり、現象としては認知できない。この結果として、生命現象としての個体の発生・分化、または個体を形成する組織・臓器の細胞の恒常性の維持、刺激に対する応答といった現象を我々は認知する。

遺伝子の転写を簡単に考えてみると、その最初のステップは転写因子という蛋白質が遺伝子の転写制御領域(プロモーター)に結合することである。これが遺伝子にスイッチを入れ、その遺伝子から mRNA が転写されて出てくる。この mRNA を検出することによって、遺伝子が発現したことを逆に知ることができる。組織のレベルでこれを検出するには *in situ* hybridization を用いる。しかし、これだけでは検出した遺伝子の機能はわからない。これを知るためには、この遺伝子を欠失させる、またはスイッチを入れる転写因子を働かせなくしてしまうなどの条件を作り、正常に働いた場合と、生体でどのような機能の異常、形態の異常が起こるのかを調べることにより、この遺伝子の機能を推定する。このような研究対象となる遺伝子は、現時点ではごく限られた数の遺伝子にすぎない。

我々はそのような条件の下で、眼組織における遺伝子発現の意義を検討してきた。実験方法および結果などの詳細はそれぞれの原著にゆずり、ここでは発生、生理、病理の項目に分け、その概略を紹介したい。

1. Ocular surface 発生における IKK α -I κ B を介した転写制御

眼瞼、角膜、結膜の上皮組織は同一の surface ectoderm から発生・分化する。では、この分化にどのような遺伝子が関与しているのだろうか。我々は nuclear factor-kappa B(以下、NF- κ B) という転写因子に注目して、研究を進めてきた¹⁾。これは特徴のある転写因子であり、通常は抑制因子 I κ B と結合して不活性の状態に細胞質の中に保持されている。この細胞にある刺激が到達すると I κ B kinase(以下、IKK) という酵素が働き、阻止因子が分解される。そうすると、この転写因子が細胞の核の中に移行し、標的遺伝子のプロモーターに結合する。そうして、この遺伝子の発現を誘導する^{2)~5)}。では、この系統の機能をなくすると、何らかの異常が出てくるはずである。そこで、IKK α を支配する遺伝子を欠失させたモデルと、IKK α が正常に働いているモデルで比較、検討を行った。

生後 0 日の正常マウスでは眼球が眼瞼で覆われているが、IKK α ノックアウトマウスでは一見して眼瞼が形成されていないようにみえた(図 1)。

弱拡大の組織像でみると、IKK α ノックアウトマウスでは、未分化な細胞から成る上皮層が眼瞼の表面から角膜になだれ込んで、連続したシートを形成していた。正常マウスにみられる、眼瞼と角膜間の解剖学的な境界は不明瞭であった。眼瞼結膜と球結膜の間のスペースも IKK α ノックアウトマウスは欠如していた(図 1)。

強拡大組織像では、正常マウスの角膜は 2 層の扁平な細胞から成る上皮と分化した実質細胞から成る整然とした形態がみられた。IKK α ノックアウトマウスでは、角膜上皮細胞は数層の丸く、大きい未分化な核を持った細胞から構成され、角膜実質細胞の分化も未熟であった(図 2 a, b)。

この時期のもう一つの明らかな差異は結膜にもみられ

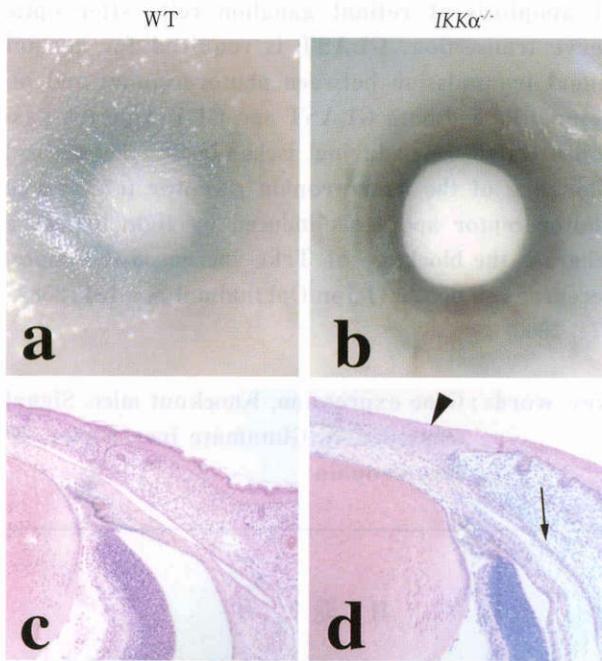


図1 生後0日のIKK α ノックアウトマウス眼の形態。生後0日の正常マウス(a, c)とIKK α ノックアウトマウス(b, d)の実体顕微鏡写真(a, b)およびヘマトキシリン-エオシン染色像。IKK α ノックアウトマウスでは一見して眼瞼が形成されていないように見える(b)。IKK α ノックアウトマウスの眼では未分化な細胞から成る上皮層が眼瞼の表面から角膜用になだれ込んで、連続したシートを形成しており(d, arrowhead)、瞼結膜と球結膜の間のスペースは欠如している(d, arrow)。WT: Wild Type (正常マウス), IKK α ^{-/-} (ノックアウトマウス) (from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3665—3669, 2000)

た。正常マウス結膜は扁平な分化した細胞がみられるのに対し、IKK α ノックアウトマウスでは核が丸く、大きい未分化な形態を示し、扁平な分化した細胞はみられなかった(図2c, d)。未熟な上皮細胞に発現するケラチン5は、生後0日の正常マウス結膜ではほとんど発現していなかったのに対し、IKK α ノックアウトマウスの結膜には非常に強く発現しており、分化の欠如を示した(図2e, f)。

さらに、角膜上皮に特異的なケラチン12抗体⁶⁾および結膜上皮に特異的なケラチン4抗体⁷⁾を用いて、正常およびIKK α ノックアウトマウスの角膜・結膜の分化を検討した。正常角膜上皮にはケラチン12が発現しているのに、IKK α ノックアウトマウスではごく僅かな染色が角膜上皮の少数の細胞にみられるのみであった(図3a, b)。ケラチン4も正常マウスの結膜では強く発現しているのに対し、IKK α ノックアウトマウスでは非常に弱かった(図3c, d)。

IKK α が角膜と結膜の分化の過程で、NF- κ B活性を調節していることを確認するため、NF- κ BとI κ Bの局在を免疫組織化学的に調べた。正常マウスでは、眼瞼の閉鎖部位の結膜が分化していく過程においてNF- κ B(p50)の

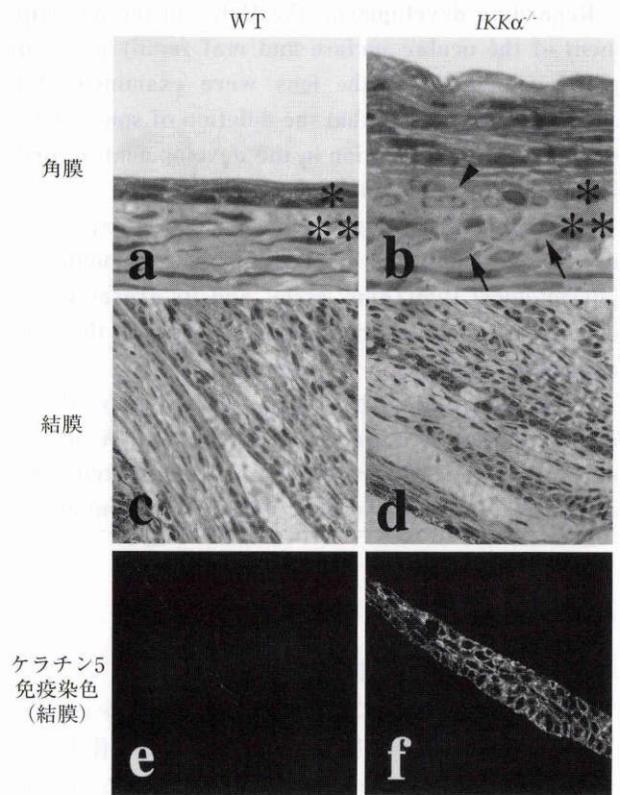


図2 生後0日のIKK α ノックアウトマウス眼の組織像。正常マウスの角膜は、2層の扁平な細胞から成る上皮と分化した実質細胞から成る整然とした形態がみられる(a)。IKK α ノックアウトマウスでは角膜上皮細胞は数層の丸く、大きい未分化な核を持った細胞から成っている(b, one asterisk)。角膜実質細胞の分化も未熟である(b, two asterisks)。正常マウスの結膜は扁平な分化した細胞がみられるのに対し、IKK α ノックアウトマウスでは核が丸く、大きい未分化な形態を示し、扁平な分化した細胞はみられない(d)。未熟な上皮細胞に発現するケラチン5は生後0日の正常マウス結膜ではほとんど発現していないのに対し、IKK α ノックアウトマウスでは非常に強く発現している(e, f)。 (from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3665—3669, 2000)

核への移動がみられた。IKK α ノックアウトマウスでは、同様の部位にNF- κ B(p50)は細胞質に局限しており、核の染色はみられなかった(図4)。I κ Bの発現は正常マウスの角膜・結膜では低かったが、IKK α ノックアウトマウスでは非常に高かった(図5)。

以上の実験結果から、IKK α 遺伝子を欠失させたためにNF- κ Bが活性化されず、角膜および結膜の発生・分化の異常が起こったのであるという結論を出すことができた。それでは、NF- κ Bという転写因子はどういう遺伝子を支配しているのであろうか。これは未知の部分が多分に多く残されている。わかっていることは上皮組織の分化に関与するケラチン遺伝子3,5のプロモーターに転写因子NF- κ Bが結合するということである⁸⁾⁹⁾。ケラチン遺伝子は大きなファミリーを形成しているが、その遺

伝子支配がどのような転写因子によってコントロールされているのかが判明すれば、一つの上皮組織から、なぜ眼瞼上皮、角膜上皮、結膜上皮が分化するかの謎が解明される日がくるであろうと考えている。

2. 水晶体発生における maf 遺伝子を介した転写制御

水晶体の発生・分化は胎生期の胚に起こっている。我々はこの発生・分化に maf 遺伝子ファミリーが関与していることをすでに報告¹⁰⁾¹¹⁾している。

この maf 遺伝子が作る蛋白質は転写因子のグループを形成し、maf 結合領域と呼ばれるプロモーターの塩基配列を認識する¹²⁾。一方、水晶体の蛋白を産生するクリス

タリン遺伝子のプロモーターには maf 結合領域が存在することがすでにわかっている¹³⁾。もしそうであるとすれば、水晶体の発生の過程でこの maf 遺伝子が発現してくるはずである。

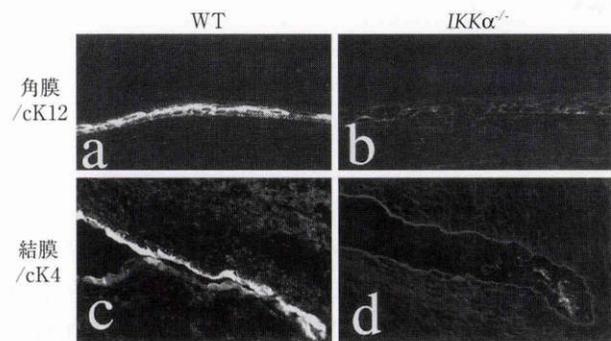


図3 生後0日のIKKαノックアウトマウスにおけるケラチン12およびケラチン4の発現。正常の角膜上皮にはケラチン12が発現している(a)が、IKKαノックアウトマウスではごく僅かな染色が角膜上皮の少数の細胞にみられるのみである(b)。ケラチン4も正常では強く発現している(c)のに、IKKαノックアウトマウスでは非常に弱い(d)。(from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3665—3669, 2000)

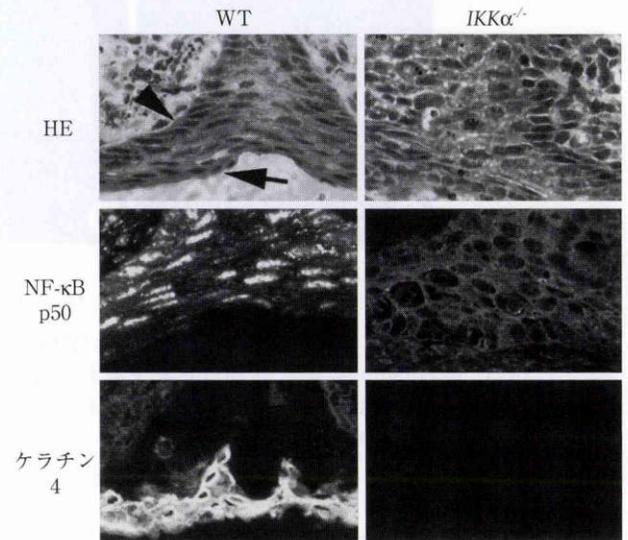


図4 正常マウスおよびIKKαノックアウトマウスにおけるNF-κB(p50)の局在。正常マウスおよびIKKαノックアウトマウスのヘマトキシリン-エオシン染色像とケラチン4, NF-κB(p50)の免疫染色像。正常マウスでは眼瞼の閉鎖部位の結膜が分化していく過程でNF-κB(p50)の核への移動がみられる。IKKαノックアウトマウスでは、NF-κB(p50)の核への染色はみられない。aの矢印は分化した結膜細胞を示す。(from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3665—3669, 2000)

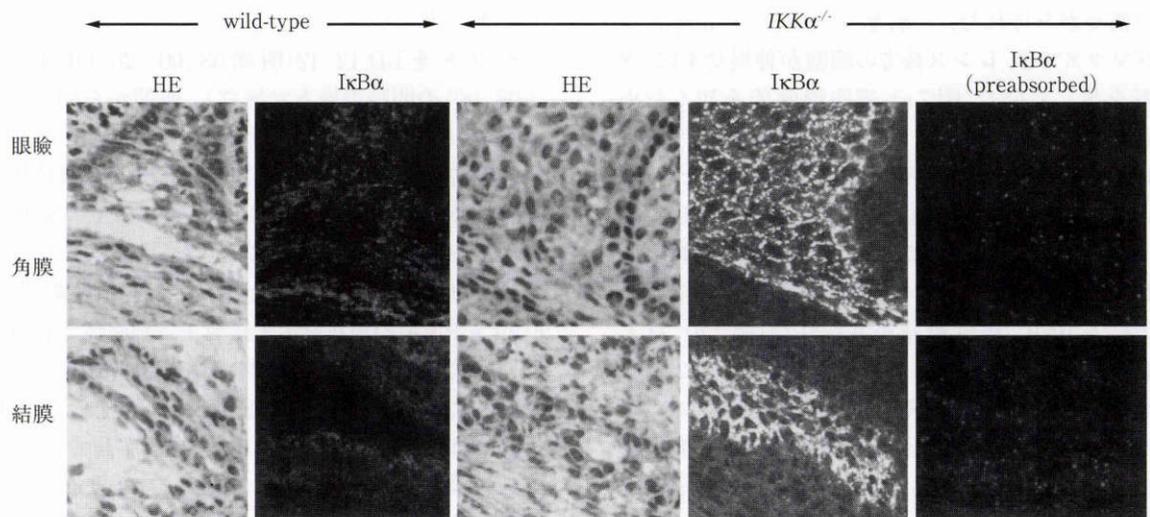


図5 正常マウスおよびIKKαノックアウトマウスにおけるIκBαの局在。正常マウスおよびIKKαノックアウトマウスにおけるヘマトキシリン-エオシン染色、角膜および結膜のIκBαの免疫染色と抗-IκBα抗体をIκBα peptideで吸収させてから反応させた陰性対照。IκBαの発現は正常マウスの角・結膜では低いが、IKKαノックアウトマウスでは非常に強い。(from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3665—3669, 2000)

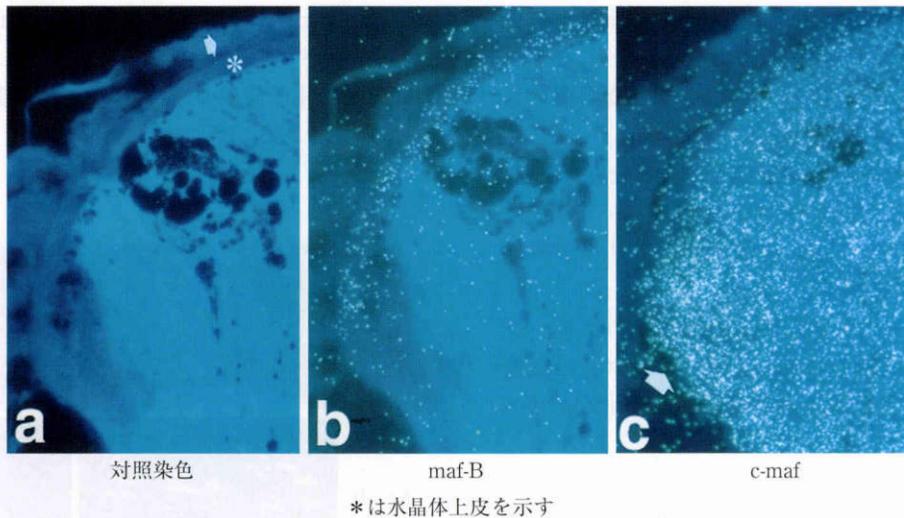


図6 胎生16日目の水晶体における maf-B と c-maf mRNA の発現。

(a) : bisbenzimidide 染色. 矢印は角膜を示す. maf-B(b)および c-maf(c)遺伝子の probe を用いた *in situ* hybridization 組織像. 矢印は水晶体赤道部を示す. (from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 2679—2683, 1997)

そこで、マウス胎生16日目の水晶体を用いて、maf-B と c-maf という2つの遺伝子の発現を *in situ* hybridization で調べてみた。maf-B は水晶体上皮細胞に発現していたが、c-maf は水晶体線維細胞に局限して発現していた(図6)。

同じ maf 遺伝子ファミリーでも水晶体の中で発現する部位が違っているということになる。もし、この一方の遺伝子を欠失させたとすると、当然そこに形成異常が出てくるはずである。そこで、c-maf 遺伝子をノックアウトしたマウスで確認するための実験を行った。

胎生18日の正常マウスの水晶体は、1層の丸い上皮細胞と規則正しく並んだ細長い水晶体線維細胞から成る整然とした構築がみられた。一方、胎生18日の c-maf ノックアウトマウスでは、レンズ後方の細胞が伸展せずに、空砲状の形を呈していた(図7c)。細胞増殖能を知るために、BrdU 取り込み実験により DNA の合成を調べた。BrdU は細胞が S-期にある時期にのみ取り込むため、増殖している細胞を反映する。正常マウスでは増殖している細胞は前方の上皮細胞に限られており、後方の細胞にはみられなかったが、c-maf ノックアウトマウスではレンズ後方にも BrdU-陽性細胞がみられた(図7d)。以上の結果は、水晶体の分化に c-maf, maf-B という2つの遺伝子が関与しており、それぞれが別の働きをしていること、片方の遺伝子を欠失させると、それに応じた発生異常が起こることを示している。我々は最近 c-maf 遺伝子の発現が転写制御因子 Pax 6 によって制御されていることを報告¹⁴⁾しており、より詳しい水晶体の発生機構が明らかになりつつある。

眼の発生を考えると、その過程において、多くの遺伝子が関与していることは論を待たない。その中の特定の遺

伝子を失活させる実験系を外眼部上皮組織の発生と水晶体の分化の2つのモデルで検討したが、特定の遺伝子の持つ働きに対応した先天異常が出現することを示す結果が得られたと結論することができよう。

III 生 理

1. 明暗変化に伴う網膜内 c-fos 遺伝子の発現

c-fos 遺伝子は早期発現遺伝子の一つであり、神経系組織において研究が進んでいる遺伝子である¹⁵⁾。そこで、我々は網膜という神経組織で網膜特有の機能である光の on, off の刺激を与えた時に c-fos 遺伝子がどのように発現し、どのような生理的役割を果たしているかを検討してきた^{16)~19)}。

ラットを LD 12:12(明期 08:00~20:00/暗期 20:00~08:00)の明暗環境下で飼育し、暗期から明期に入った30分後(08:30)にラット網膜を取り出し、*in situ* hybridization を行った。c-fos mRNA の発現は内顆粒層と神経節細胞層にみられた(図8)。c-fos mRNA の発現は内顆粒層においては層内全域にみられ、内側部に比べて外側部により強い傾向を示した(図8C)。神経節細胞層では、c-fos mRNA の局在を示す銀粒子は細胞体上に強く集積していた(図8C)。外顆粒層では c-fos mRNA は暗期に発現した(図8B)。c-fos mRNA の発現を示す銀粒子の大部分は、外顆粒層内にほぼ均一に分布していた。

内顆粒層における c-fos mRNA の発現量を時間経過で調べると、光照射を開始する直前(08:00)と、光照射を開始してから5分後(08:05)では、c-fos mRNA の発現はほとんどみられないが、15分後(08:15)に急激に増加した。30分後(08:30)に最高値に達し、2時間後(10:00)に光照射前の値まで減少した(図9)。なお、神経節細胞層の

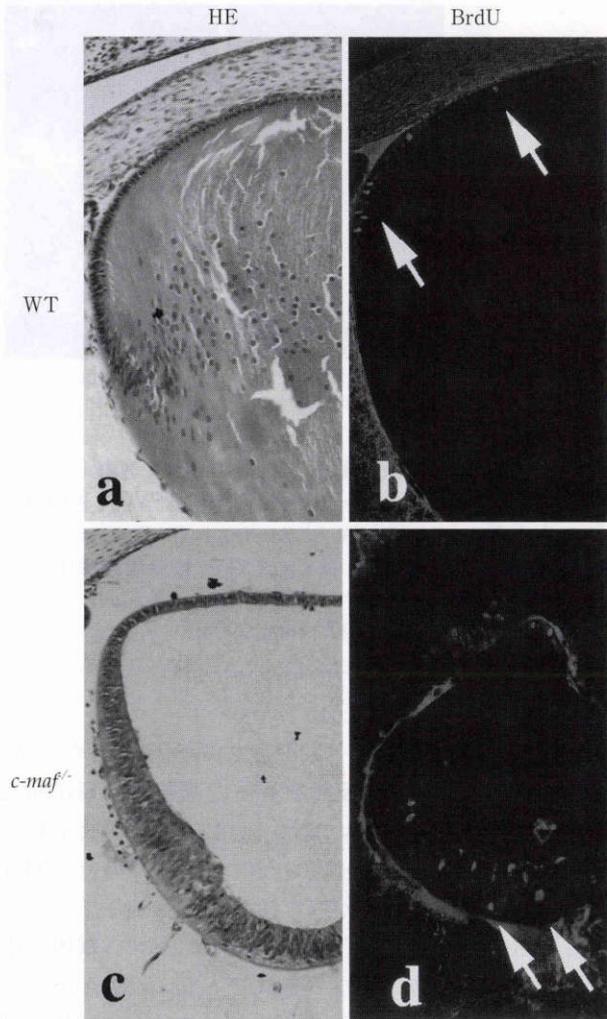


図7 胎生18日目の正常と *c-maf* ノックアウトマウスの水晶体。

胎生18日目の正常(a, b)と *c-maf* ノックアウトマウス(c, d)水晶体のヘマトキシリン-エオシン染色像(a, c)と BrdU 染色像(b, d)。胎生18の正常マウス水晶体は1層の丸い上皮細胞と規則正しく並んだ細長い水晶体線維細胞から成る整然とした構築がみられる(a)。胎生18日 *c-maf* ノックアウトマウスではレンズ後方の細胞が細長くならず、空砲状の形になっている(b)。正常マウスでは増殖している細胞は前方の上皮細胞に限られており、後方の細胞にはみられない。*c-maf* ノックアウトマウスではレンズ後方にも BrdU-陽性細胞がみられる(d)。

c-fos mRNA の発現もほぼ同様の経時的变化を示した。

外顆粒層における *c-fos* mRNA の発現量は、暗期に入ってから30分後(20:30)に急激に増加し、以後、暗期の間、持続的に高い発現量を示した(図9)。そして、次の明期が始まって30分後(08:30)に発現量は急激に減少し、その後、明期の間は低値を示した。このように、外顆粒層の *c-fos* mRNA 発現は暗期に高値で、明期に低値の周期的変動を示すことが明らかになった。

そこで、外顆粒層における *c-fos* mRNA の周期的変動が連続暗黒の条件下でもみられるかどうかを検討した。

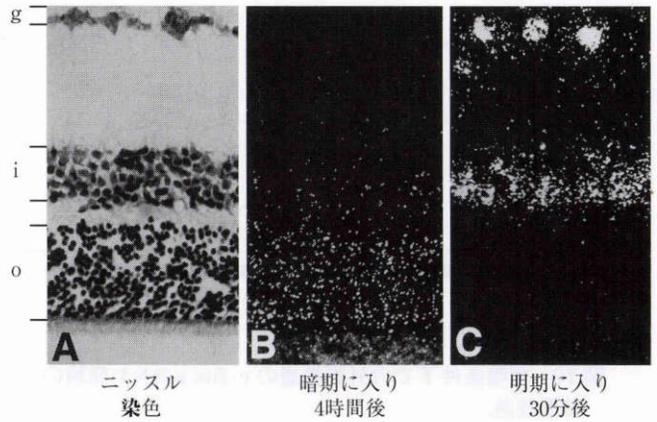


図8 明暗変化に伴う網膜内 *c-fos* mRNA の発現。

A: ラット網膜標本のニッスル染色, B: LD 12:12 条件下で、暗期に入ってから4時間後(22:30)銀粒子は外顆粒層に分布する。C: LD 12:12 条件下で、照明を開始して30分後(08:30)におけるラット網膜内での *c-fos* mRNA の発現。銀粒子は内顆粒層および神経節細胞層に分布する。o: 外顆粒層, i: 内顆粒層, g: 神経節細胞層。(from Yoshida K, et al: Neuron 10: 1049-54, 1993)

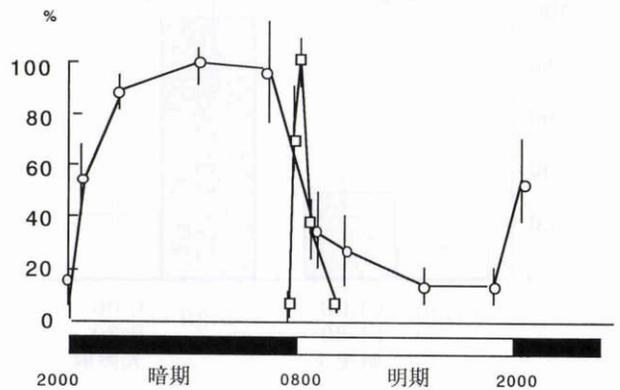


図9 LD 12:12 における網膜内 *c-fos* mRNA 発現の時間経過。

横軸は網膜を採取した時刻。黒で表示した時間帯は暗期、白で表示した時間帯は明期。内顆粒層では最大値を示した08:30の値、外顆粒層では最大値を示した06:30の値に対する各標本の値を百分率で表示した。内顆粒層の *c-fos* mRNA は照明を開始してから30分後(20:30)に最高値に達し、2時間後(22:00)に照射前のレベルに減少したのに対し、視細胞内の *c-fos* mRNA は、暗期の間高い値を継続した。(from Yoshida K, et al: Neuron 10: 1049-1054, 1993)

○: 外顆粒層, □: 内顆粒層

LD 12:12 の暗期(20:00~08:00)の後、明期に入ってもラットをそのまま暗黒下で飼育し、08:30から経時的に網膜を採取した。このような恒暗条件下でも、08:30~20:00の間、外顆粒層の *c-fos* mRNA の発現量は減少し、翌日の20:30以降、外顆粒層の *c-fos* mRNA の発現量が再び増加した(図10)。

次に、網膜における *c-fos* mRNA の発現量が明暗の変化に直接応答して増減するかどうかを調べるため、ラッ

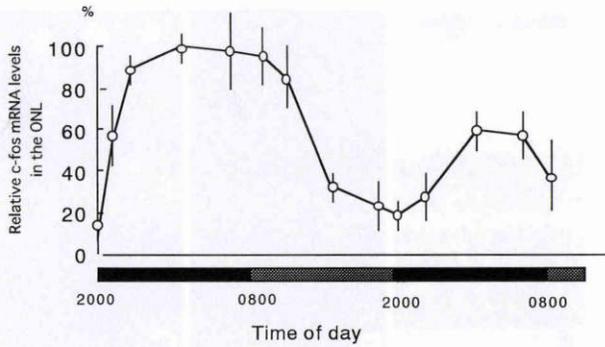


図 10 恒暗条件下での外顆粒層の c-fos mRNA 発現の時間経過。

LD 12:12 の暗期の後、ラットをそのまま連続暗黒下で飼育し、経時的に網膜を採取した。LD 12:12 の最大値である 06:30 の値に対する各標本の値を百分率で表示した。翌日の 20:30 以降、外顆粒層の c-fos mRNA が再び増加した。(from Yoshida K, et al: Neuron 10: 1049—1054, 1993)

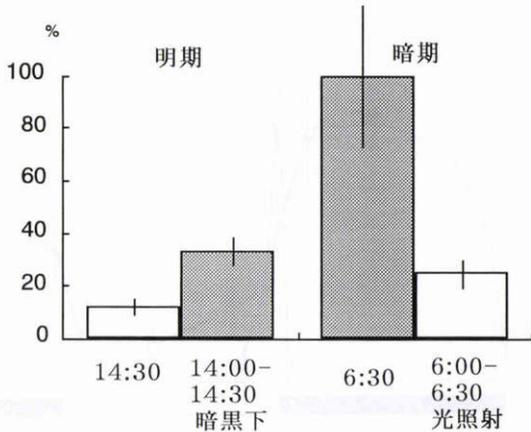


図 11 一過性明暗環境の変化に伴う網膜内 c-fos mRNA の発現。

ラットを暗期(06:00)に30分間光照射した後と、明期(14:00)に30分間暗黒下に移した後に網膜を採取した。明期(14:00)に30分間暗黒下に移したラットの網膜では外顆粒層の c-fos mRNA は LD 12:12 の明暗環境下での同時刻(14:30)の発現量に比べ増加していた(第5図)。暗期(06:00)に30分間光照射したラットの網膜では外顆粒層の c-fos mRNA は LD 12:12 の明暗環境下での同時刻(06:30)の発現量に比べ減少していた。(from Yoshida K, et al: Neuron 10: 1049—1054, 1993)

トを暗期(06:00)に30分間光照射した後に眼球を摘出したものと、明期(14:00)に30分間暗黒下に移した後に摘出したものとで発現量を測定した。その結果、明期(14:00)に30分間暗黒下に移したラット網膜では、外顆粒層の c-fos mRNA は LD 12:12 の明暗環境下での同時刻(14:30)の発現量に比べ増加していた。これに対して、暗期(06:00)に30分間光照射したラットの網膜では、外顆粒層の c-fos mRNA は LD 12:12 の明暗環境下での同時

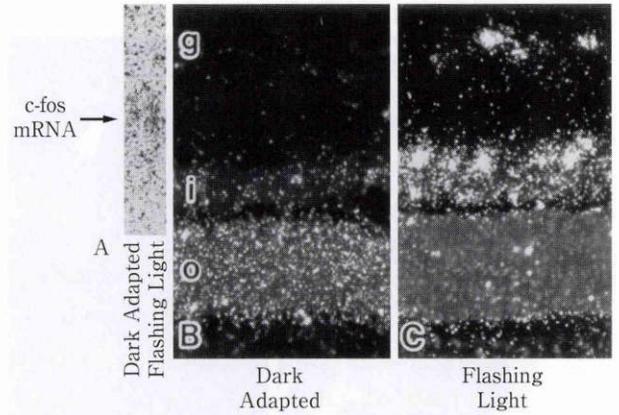


図 12 点滅光照射後の c-fos mRNA 発現。

Northern blot では c-fos mRNA の発現量が点滅光照射の後上昇している。(図 A)。in situ hybridization で c-fos mRNA は光を照射しはじめてから30分後、内顆粒層と神経節細胞層にみられる(B, C)。(from Yoshida K, et al: J Neurochem 65: 1499—1504, 1995)

刻(06:30)の発現量に比べ減少していた(図 11)。なお、暗期(06:00)に30分間光照射を行った網膜の内顆粒層および神経節細胞層においては、LD 12:12 の明暗環境下で照明を開始して30分後(08:30)の網膜の場合と同様に、c-fos mRNA の発現がみられた。

これらの所見は生理的な明暗周期において、網膜を構成する各神経細胞は異なる様式で c-fos mRNA を発現すること、その発現は明暗環境の外的変化と内因性時計機構に依存していることを示す結果であった。

2. 明暗変化に伴う網膜細胞の情報伝達

光の on, off 刺激が網膜細胞に到達した時に、網膜細胞内のどのような情報伝達路を通して遺伝子の発現を誘導するのであろうか。これを検討するために我々はいくつかの実験を行った^{17) 20) 21)}。

c-fos 遺伝子の upstream には転写制御領域 cAMP response element (CRE) が存在し、これに結合する転写因子は cAMP response element binding protein (CREB) と呼ばれている。そして、CREB のアミノ酸 Ser-133 がリン酸化されることにより c-fos 遺伝子の発現が制御されることが知られている²²⁾。そこで、網膜に点滅光を照射した時の c-fos mRNA の発現と CREB のリン酸化を検討した。

まず、c-fos 遺伝子の発現を暗順応網膜と点滅光照射後の網膜で調べた。Northern blot では c-fos mRNA の発現量が光照射の後上昇していた(図 12 A)。in situ hybridization では c-fos mRNA は光を照射しはじめてから30分後、内顆粒層の内側と神経節細胞層にみられた(図 12 C)。

次に、CREB が明暗変化に対応して網膜細胞でリン酸化されているかを調べた。Western blotting 法では、リン酸化した CREB は点滅光照射を開始して1分後にみら

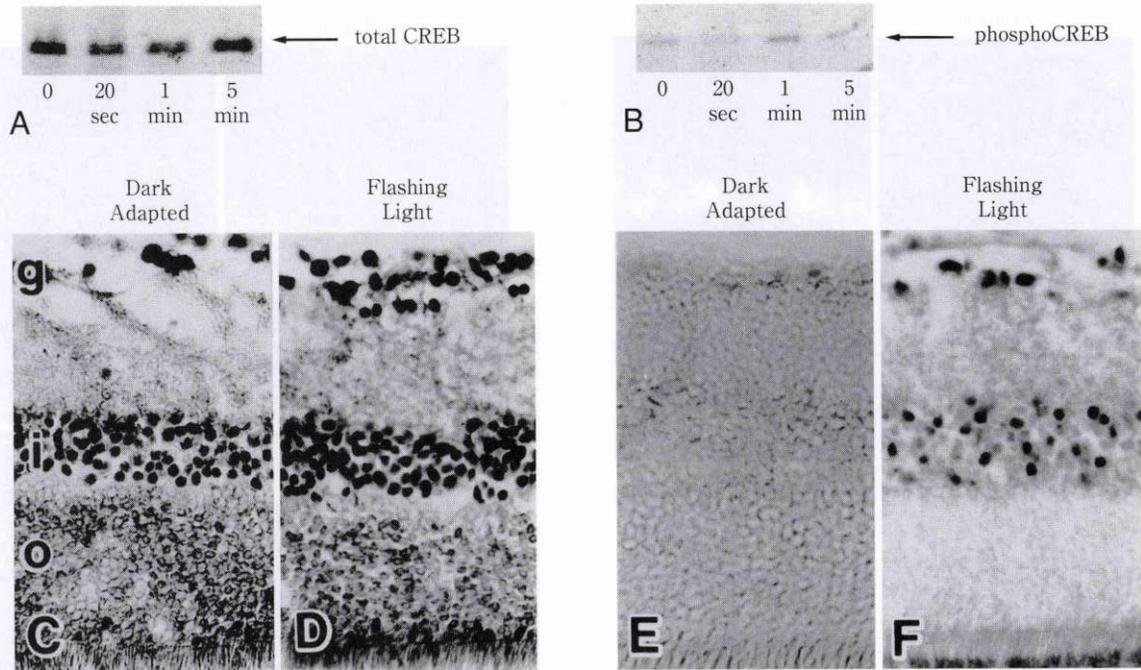


図 13 点滅光照射に伴う cAMP response element binding protein (CREB) リン酸化。

CREB (A, C, D) およびリン酸化した CREB に対する抗体 (B, E, F) を用いた western blot (A, B) と免疫染色 (C~F). (C, E) 暗順応した網膜. (D, F) 点滅光照射後の網膜. CREB 蛋白 (43 kDa) は光照射前にも存在し, 光を照射しても量に変化はみられない (A). CREB immunoreactivity (CREB-IR) は内顆粒層と神経節細胞層にみられ, 光照射前と照射後に違いはみられない (C, D). リン酸化した CREB は点滅光照射を開始して 1 分後にみられる (B). Phosphorylated CREB immunoreactivity (PCREB-IR) は暗期の網膜ではどこにもみられない (E). 光照射後では, PCREB-IR 内顆粒層と神経節細胞層にみられる (F). (from Yoshida K, et al: J Neurochem 65: 1499-1504, 1995)

れた (図 13 B). リン酸化された CREB も脱リン酸化された CREB も認識する #244 anti-CREB antibody²³⁾ では CREB 蛋白 (43 kDa) は光照射前にも存在し, 光を照射しても量に変化はみられなかった (図 13 A). CREB immunoreactivity (CREB-IR) は内顆粒層と神経節細胞層にみられ, 光照射前と照射後に違いはみられなかった (図 13 C, D). それに対して phosphorylated CREB immunoreactivity (PCREB-IR) は暗期の網膜ではどこにもみられなかった (図 13 E). 光照射後では, PCREB-IR は内顆粒層と神経節細胞層にみられた (図 13 F). 内顆粒層ではアマクリン細胞が存在する内層にもみられた.

培養細胞を用いた実験により calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaM kinase II) が CREB をリン酸化することが知られているので²²⁾²⁴⁾, L-type Ca channel activator を投与した時の c-fos mRNA の発現と CREB のリン酸化および CaM kinase II の局在について検討した. LD 12:12 明暗周期の明期 (14:00) に Ca channels activator Bay K 8644 (1 mg/kg) を腹腔注射して, 45 分後では c-fos mRNA は視細胞やアマクリン細胞と思われる内顆粒層の最内層の細胞, 神経節細胞にみられた (図 14 B). しかし, rod bipolar cells が分布する内顆粒層の外層にはみられなかった.

次に, Bay K 8644 に伴うカルシウム流入が CREB リン

酸化を惹き起こすかについて検討した. Bay K 8644 (1 mg/kg) を注射して 15 分後には, PCREB-IR は内顆粒層と神経節細胞層にみられた (図 14 D). 内顆粒層では, PCREB-IR はアマクリン細胞が分布する内側境界に局在していた. anti-CaM kinase II monoclonal antibody を用いて PCREB-IR と二重染色すると, 神経節細胞やアマクリン細胞が両方の抗体で染色された (図 14 E, D).

以上の結果は, 網膜に光刺激が到達すると, L-type channel を介したカルシウムの流入が CaM kinase II を活性化し, これが CREB をリン酸化する情報伝達系が網膜に存在することを示すものであった.

3. 網膜の視覚伝達と metabotropic glutamate receptor 6 (mGluR 6)

c-fos の発現が網膜の視覚伝達路を通して行われているのか, それとも光の on, off 刺激が直接それを誘導したのかを確かめる必要がある. そのためには視細胞とその次にある双極細胞間の刺激伝達がなければ, 前述の現象が起こらないことを確認すればよい. 視細胞と双極細胞間の神経伝達物質はグルタミン酸であり, これに対応する双極細胞のレセプターは mGluR 6 である²⁵⁾.

そこで, mGluR 6 欠失マウスと正常マウスを用い検討した²⁵⁾. 抗 mGluR 6 抗体を用いた免疫染色では, 正常マウスでは双極細胞が分布する外顆粒層で点状の染色性が

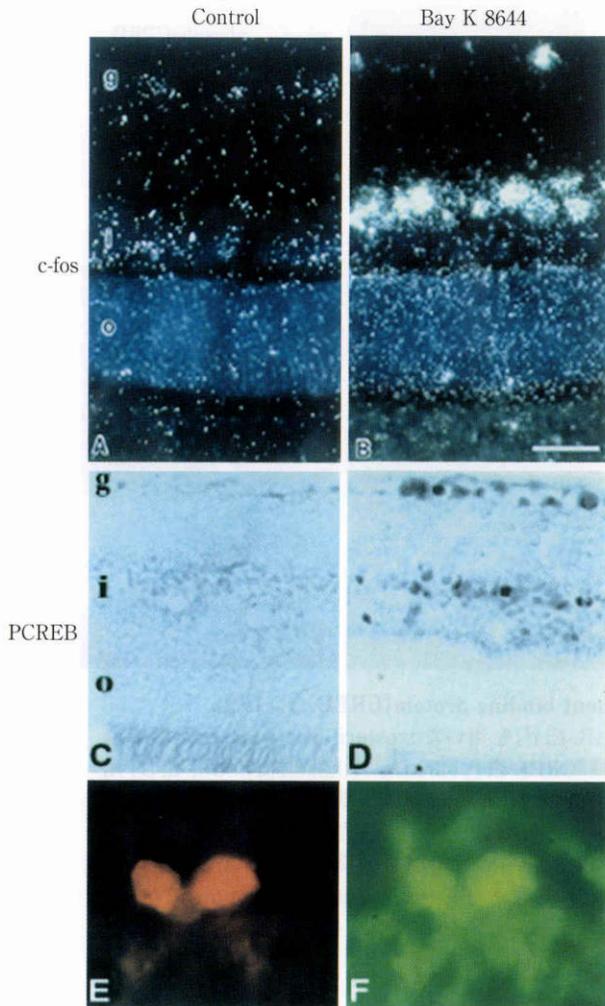


図 14 Ca channels activator 投与による c-fos mRNA 発現と CREB リン酸化.

12:12 の明暗周期(LD 12:12)の明期(14:00)に Ca channels activator Bay K 8644(1 mg/kg)を腹腔注射して 45 分後では c-fos mRNA は視細胞やアマクリン細胞と思われる内顆粒層の最内層の細胞, 神経節細胞にみられる(B). Bay K 8644(1 mg/kg)を注射して 15 分後には, PCREB-IR は内顆粒層最内層の細胞と神経節細胞層にみられた(D). (A, C)同時刻に PBS を腹腔投与した陰性対照. 坑 CaM kinase II monoclonal antibody を用いて PCREB-IR と二重染色すると, 神経節細胞が両方の抗体で染色された(E, F). (from Yoshida K, et al: J Neurochem 65: 1449—1504, 1995)

みれたのに対し, ノックアウトマウスでは全く染色されなかった(図 15). 正常マウスでは持続光照射 5 分後に PCREB-IR が内顆粒層と神経節細胞層にみられたが, mGluR6 欠失マウスにおいては持続光照射によって PCREB-IR が誘導される細胞はほとんどなかった(図 15). 両方のマウスにおいて, c-fos mRNA は PCREB-IR と同様の分布を示した. この成績は, c-fos の発現と CREB のリン酸化は mGluR6 を介した網膜細胞内の情報伝達に依存していることを示している.

ここまで, 網膜における c-fos 遺伝子の発現と, それに

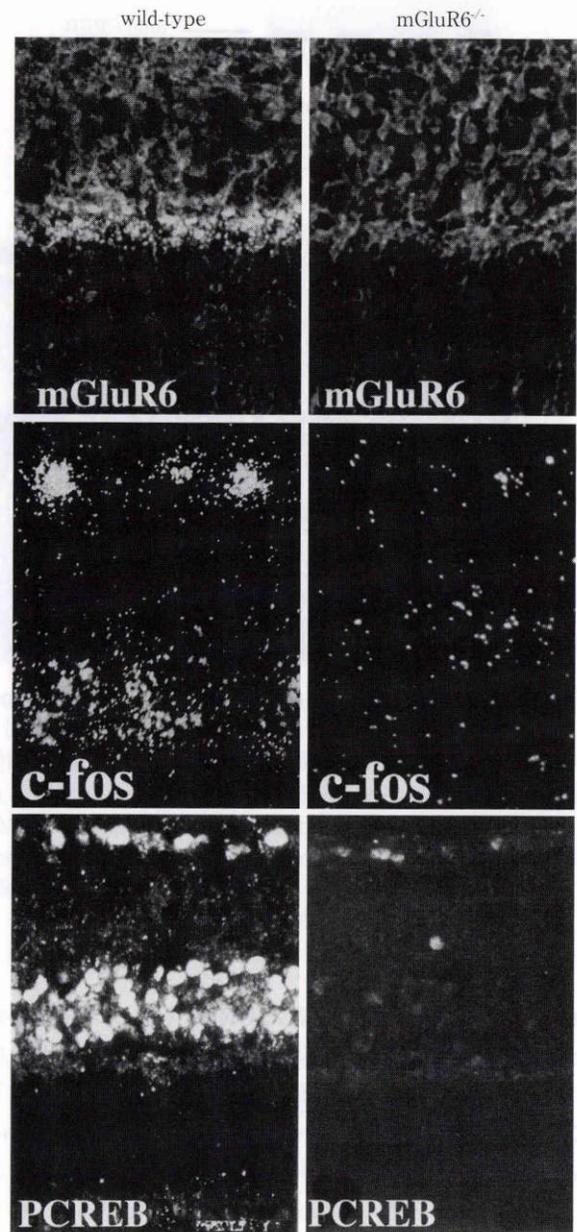


図 15 正常および mGluR6 ノックアウトマウスにおける c-fos 遺伝子発現と CREB リン酸化.

光照射後の正常および mGluR6 ノックアウトマウス網膜の mGluR6 免疫染色および c-fos 遺伝子プローブを用いた *in situ* hybridization. 正常マウス網膜を mGluR6 に対する抗体で免疫染色すると, 視細胞と双極細胞とのシナプスが分布する外網状層に一致して陽性反応がみられるが, ノックアウトマウスではみられない. 正常マウスでは内顆粒層, 神経節細胞に c-fos の発現および CREB リン酸化がみられるが, ノックアウトマウスではみられない. (from Yoshida K, et al: Mol Brain Res 57: 241—247, 1998)

関与する情報伝達系について記述してきた. では, この遺伝子は網膜でどのような生理的役割を持つのであろうか. 種々なことが推測される.

一つは c-fos 遺伝子から作られる機能蛋白 Fos はもう一つの早期遺伝子である jun family 遺伝子から作られ

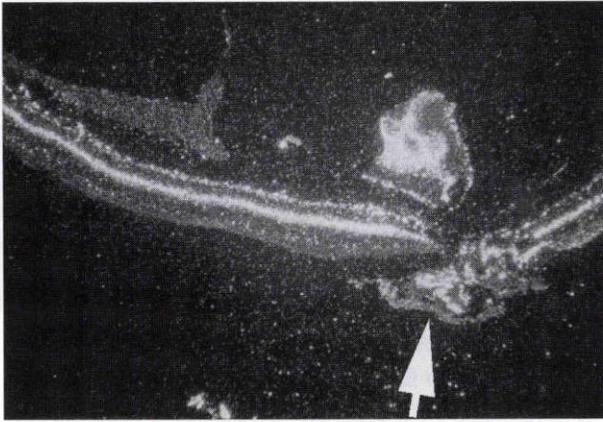


図 16 穿孔性外傷 30 分後の網膜における c-fos 遺伝子発現.

LD 12:12 の明期(14:00)に穿孔性外傷を受けて 30 分後に c-fos mRNA の強い発現が網膜内にみられる. c-fos mRNA は網膜全体にみられるが,穿孔創から離れた所よりも穿孔創の近くに強く発現している. (from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 251-254, 1995)

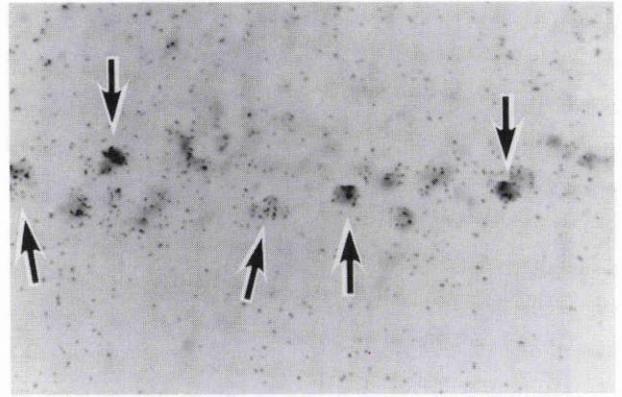
る蛋白質 Jun と結合して,転写因子 AP-1 を作ることが明らかにされている.我々は jun 遺伝子が c-fos と同じように,光刺激によって網膜に発現することをすでに確認している²⁶⁾.それで,網膜においても転写因子 AP-1 が形成されていることは確かであろう.一方,これらの2つの遺伝子から作られた機能蛋白は heterodimer を作って, AP-1 site と呼ばれるプロモーターの塩基配列を認知する.逆にいうと,プロモーターに転写因子 AP-1 が認識する塩基配列を持っている遺伝子の発現を誘導する可能性が考えられる.それでは,網膜ではどうか.視覚に関係するロドプシン遺伝子, phospho-diesterase 遺伝子などのプロモーターには AP-1 site があることがわかっている²⁷⁾²⁸⁾.もし,これが正しいとすると,光刺激による c-fos の発現はこれらの遺伝子の発現を誘導することになり,網膜における重要な生理機能を支配していることが想像される.しかし,現時点ではこのことが正しいとする確証は得られていない.これは今後に残された大きな課題であろう.

IV 病 理

視覚器,特に網膜で病変が起こると,そこではどのような遺伝子が発現し,それがどのような役割を果たしているのか,臨床面からも知りたくなる.それで,我々はいくつかの実験条件を設定してこの問題を検討してきた.

1. 外傷に伴う網膜 Müller 細胞の転写因子

網膜病変の代表として,動物の眼に赤道部から 20 ゲージ針を穿孔させて,網膜に穿孔創を作るという単純な実験条件を設定した.そして,30 分後に網膜を取り出して c-fos の発現を調べた²⁹⁾.



矢印はミュラー細胞の核 (s100染色) を示す

図 17 *in situ* hybridization 前に s-100 蛋白の免疫染色を行った組織像.

c-fos mRNA は s-100 蛋白陽性細胞にみられる. (from Yoshida K, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 251-254, 1995)

LD 12:12 の明期(14:00)には正常ラット網膜には c-fos 遺伝子は発現していないことはすでに記述した.ところが,同じ時間に穿孔性外傷を受けて 30 分後の網膜では c-fos mRNA の強い発現が網膜内にみられた(図 16). c-fos mRNA は網膜全体にみられたが,穿孔創から離れた所よりも穿孔創のすぐ近くの方が強く発現していた. *in situ* hybridization の前に s-100 蛋白の免疫染色をすることにより, c-fos mRNA が Müller 細胞に発現していることが明らかになった(図 17). また,網膜に穿孔創を作って 5 分後には内顆粒層と神経節細胞層に CREB リン酸化がみられた(図 18)³⁰⁾.

このことは,網膜では光刺激だけではなく,穿孔創という外傷刺激により c-fos 遺伝子が発現し,さらに転写因子 CREB のリン酸化も起こること,この発現部位は網膜の Müller 細胞が中心であることを示している.これが,創傷治癒に結びつくのかということは,未だ確認していない.これは今後の問題と考えている.

2. 神経節細胞における Jun リン酸化と細胞死

Fos 蛋白と Jun 蛋白が heterodimer を作ると, AP-1 site の転写因子 AP-1 になることは前述した.最近, Jun 蛋白の N 端の serines 63 と 73 が c-Jun リン酸化酵素 (JNKs) によりリン酸化されるとアポトーシスを誘導することが報告³¹⁾³²⁾されるようになってきた.

眼球の後ろで視神経を切断すると,網膜の神経節細胞はアポトーシスに陥る.それでは,この Jun 蛋白のリン酸化を防ぐことができれば,視神経の切断があったとしても網膜の神経節細胞をアポトーシスから防御できる可能性がある.

これを確かめるにはどのようなことをしたら良いであろうか.正常な c-Jun 蛋白のアミノ酸配列 63 番目と 73 番目の Ser がリン酸化を受けることがすでにわかっているので³¹⁾³²⁾,この 63 番目と 73 番目のアミノ酸を Ser か

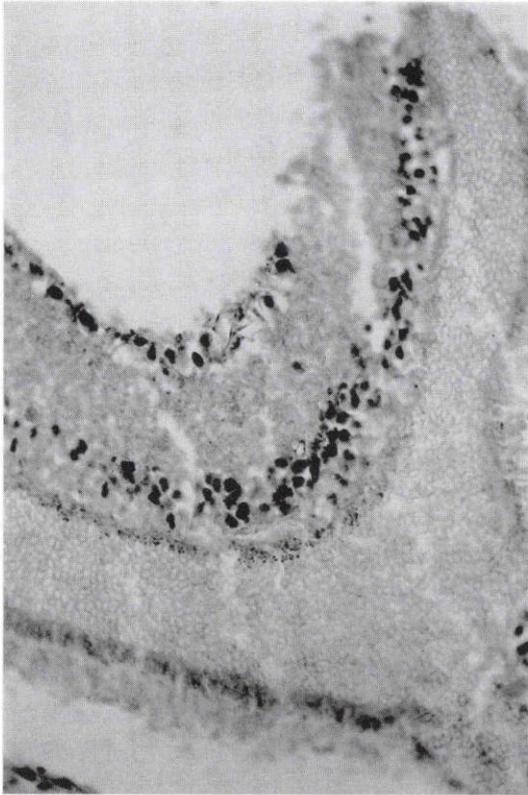


図 18 穿孔性外傷 5 分後の網膜における CREB リン酸化.

LD 12:12 の明期(14:00)に穿孔性外傷を受けて 5 分後にリン酸化された CREB が内顆粒層と神経節細胞層にみられる。(from Harada T, et al: Exp Eye Res 61:769-772, 1995)

ら別のアミノ酸に変えればその目的に適合する,このような遺伝子操作をした動物を c-Jun(AA)ノックインマウスと呼んでいる³³⁾.このマウスと正常マウスの 2 系統を用いて,両方とも視神経を眼球の後ろで切断し,アポトーシスが起るかどうか,c-Jun のリン酸化が起こるかを検索した.

正常マウスでもノックインマウスでも視神経切断 7 日後に c-Jun に対する抗体で免疫染色すると,神経節細胞に陽性反応がみられた(図 19).同じ c-Jun の中でリン酸化されたものにだけ反応する抗体で染色すると,正常マウスでは 7 日後に陽性像がみられたが,ノックインマウスでは全くみられなかった(図 19).さらに,アポトーシスを特異的に示す TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method(TUNEL)染色を行うと,正常マウスの 7 日後では陽性細胞数が非常に増えていたが,ノックインマウスでは TUNEL 陽性細胞の数は正常マウスの 25%に減少していた(図 20).

このことは c-Jun という転写因子のアミノ酸配列の一部を変換することによって,網膜の神経節細胞を死滅から救うという方法が可能であるということを示しているし,逆に c-Jun という蛋白質がリン酸化されると,

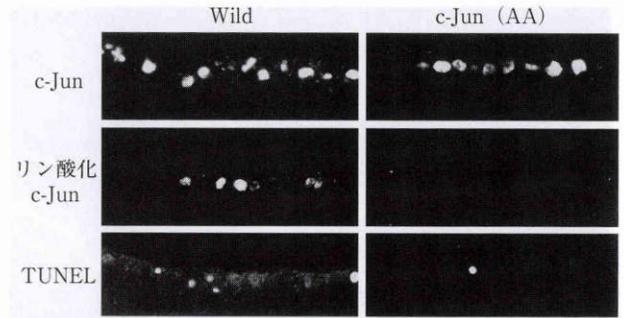


図 19 c-Jun(AA)ノックインマウスにおける視神経切断後の c-Jun 蛋白リン酸化の欠如とアポトーシスの減少.

視神経切断後 7 日目の正常および c-Jun(AA)ノックインマウス網膜の抗 Jun 抗体と抗リン酸化 Jun 抗体を用いた免疫染色および TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method(TUNEL)染色.正常マウスでは c-Jun, phospho-c-Jun および TUNEL 陽性像は視神経切断 7 日後に多くの神経節細胞にみられるが,ノックインマウスでは phospho-c-Jun 陽性像はみられず,TUNEL 陽性細胞も少ない.

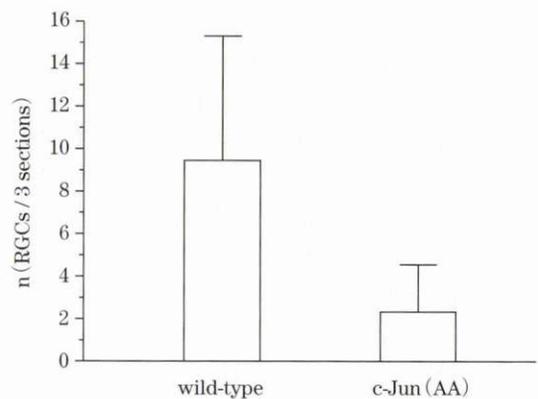


図 20 視神経切断後の TUNEL 陽性細胞の数. c-Jun(AA)ノックインマウスでは TUNEL 陽性細胞の数は正常マウスの 25%に減少している.

網膜の神経節細胞がアポトーシスに向かうという裏返しでも理解できる.

3. 視覚伝達とグルタミン酸トランスポーター

網膜を含めて中枢神経の興奮性神経伝達物質の大部分はグルタミン酸である.これは,プレシナプスから放出されてポストシナプスのレセプターに到達して刺激の伝達に働くが,このグルタミン酸が組織間隙やシナプス間隙に高濃度に存在すると,興奮毒性を起し,逆に機能を阻害することが最近わかってきた.そこで,シナプス間隙のグルタミン酸を常に一定濃度に保つ機能が必要になる.この役割を果たしているのが,グルタミン酸トランスポーターである^{34)~36)}.中枢神経では,現在 5 種類ほどのグルタミン酸トランスポーターの存在が知られているが,そのうちグリア細胞に発現する GLAST と GLT-1 が特に重要な機能を持つと考えられている^{37)~41)}.

まず、網膜における GLAST および GLT-1 の分布を免疫染色により調べた。その結果、網膜ではグリア細胞(主に Müller 細胞)に強く発現するのは GLAST であり、GLT-1 は視細胞・双極細胞に発現する神経細胞型の 1 つと考えられた(図 21)。

では、網膜においてこれらがどのような働きをしてい

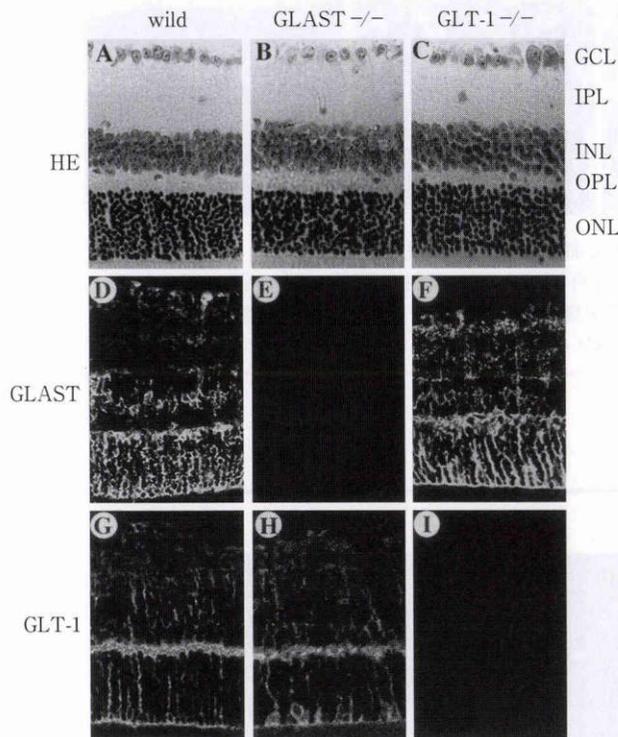


図 21 マウス網膜におけるグルタミン酸トランスポーター GLAST および GLT-1 の分布。(A~C)GLAST および GLT-1 欠失マウスの網膜層構造に変化はみられない。(D-I)GLAST は Müller(グリア)細胞に、GLT-1 は視細胞および双極細胞に分布する。各々のノックアウトマウスでは免疫陽性像の消失が確認された。(from Harada T, et al: Proc Natl Acad Sci USA 95: 4663-4666, 1998)

るのであろうか。そこで、GLAST および GLT-1 の遺伝子欠失マウスの網膜電位図を調べてみた。GLAST 欠失マウスでは律動様小波と b 波の減弱がみられたが、GLT-1 欠失マウスでは正常であった(図 22)。

次に、GLT-1 および GLAST の遺伝子欠失マウスの網膜を用いて虚血負荷実験を行ったところ、GLT-1 欠失マウスでは正常マウスの約 2 倍、GLAST 欠失マウスでは正常マウスの約 3 倍に及ぶ網膜内層の菲薄化(網膜神経細胞死)が観察された(図 23)。GLAST 欠失マウスでは GLT-1 欠失マウスより強い網膜内層の障害がみられ、内顆粒層までがほぼ消失していた。

この実験結果は、次のように解釈することができよう。正常マウス網膜では神経伝達物質グルタミン酸が組織間隙に放出されると、Müller 細胞に発現するトランスポーター GLAST によって処理されるが、ノックアウトマウスではこの処理ができず、過剰なグルタミン酸が組織間隙の中に存在する。そして、網膜電位図の波形に変化を起こす程度の障害が生じる。さらに、網膜に虚血という条件が生じた時にはグルタミントランスポーター GLAST と GLT-1 の両者が協調して働いて網膜組織を保護することも考えることができよう。

4. 光変性網膜における視細胞死とニューロトロフィン受容体

網膜視細胞は強い光によってアポトーシスを起こし、変性、脱落する¹⁹⁾⁴²⁾。最近になり、多くの神経栄養因子に抗アポトーシス作用があること、神経細胞の生死が標的器官から放出される栄養因子に依存していること、またそれが発生時のシナプス形成にも関与することが明らかとなっている⁴³⁾⁴⁴⁾。栄養因子の重要なメンバーであるニューロトロフィン(NGF, BDNF, NT-3, NT-4)とその受容体(高親和性 trk 受容体: trkA, trkB, trkC, および低親和性 p 75 受容体)は網膜および視覚中枢に広く分布しており、その発達と形成に重要な役割を果たしている⁴⁵⁾。また、外傷や遺伝性疾患などによる網膜変性におい

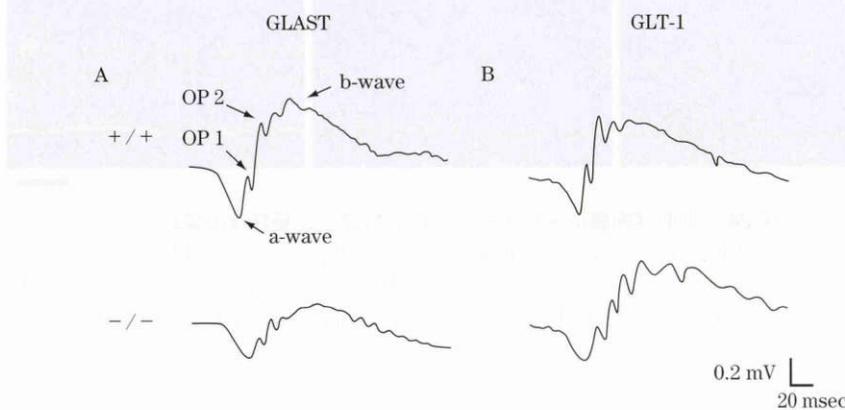


図 22 GLAST および GLT-1 欠失マウスの網膜電位図。

GLAST 欠失マウスでは律動様小波と b 波の減弱をみる(A)が、GLT-1 欠失マウスの網膜電位図には変化がみられない(B)。(from Harada T, et al: Proc Natl Acad Sci USA 95: 4663-4666, 1998)

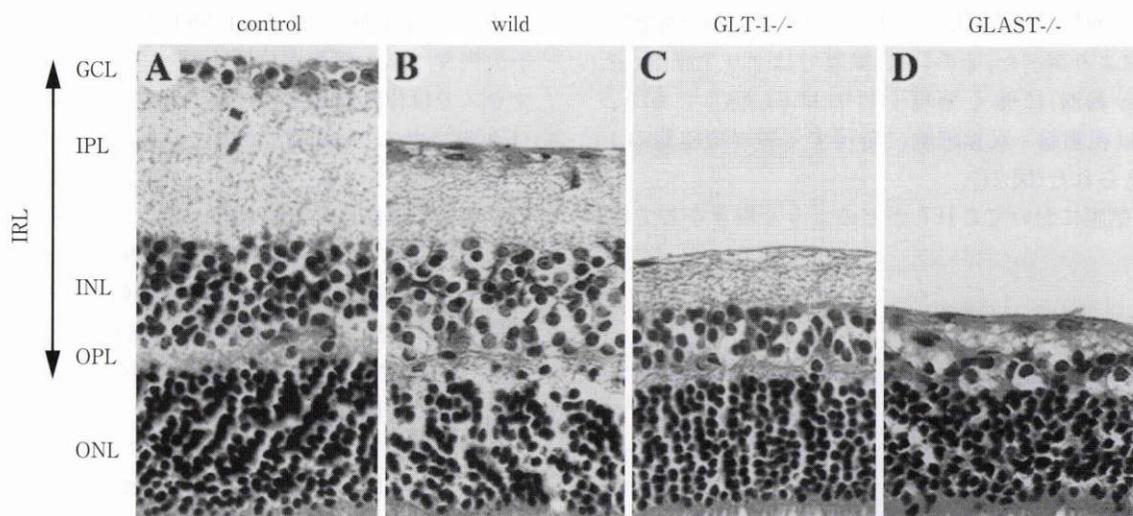


図 23 GLAST および GLT-1 欠失マウスにおける虚血負荷後の網膜組織像。

(A) 対照の正常マウス網膜, (B~D) 虚血を 60 分間負荷し, 再灌流して 7 日目の網膜. (B) 正常マウス, (C) GLT-1 欠失マウス, (D) GLAST 欠失マウスの光学顕微鏡写真 (ヘマトキシリン-エオシン染色). (from Harada T, et al: Proc Natl Acad Sci USA 95: 4663-4666, 1998)

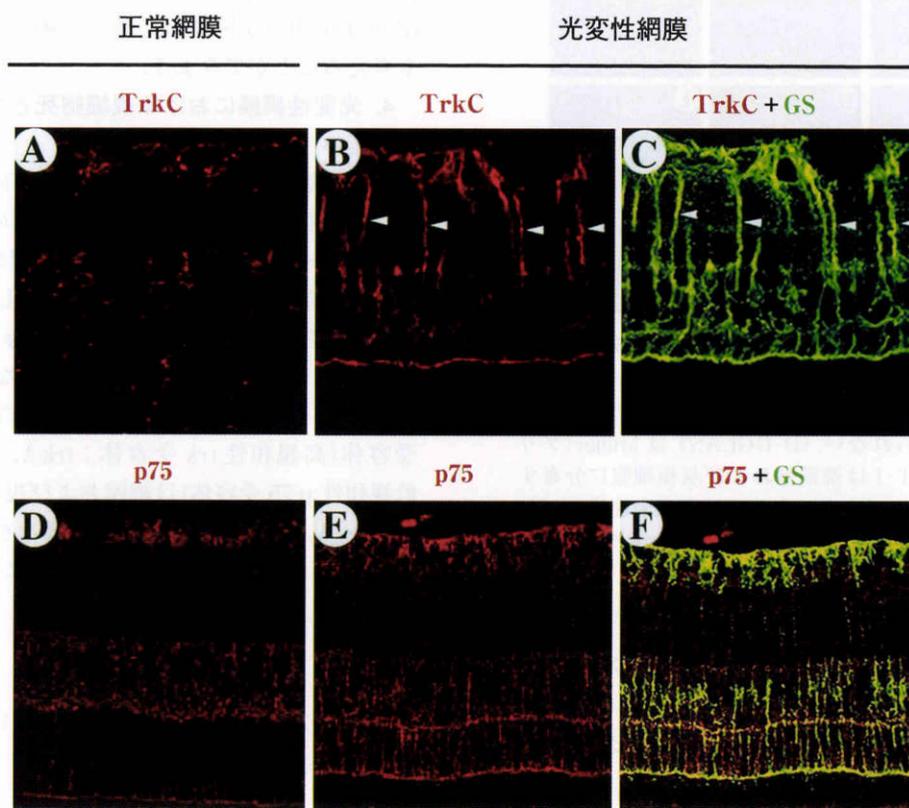


図 24 光変性網膜におけるニューロトロフィン受容体の発現。

(A, D) 生後 35 日齢の正常網膜. (B, C, E, F) 生後 35 日齢の光変性網膜. TrkC は網膜内層側 (B, 矢印), p75 は網膜外層側 (E) で増加している. グルタミン合成酵素 (GS) との二重染色により, これらの部位は Müller 細胞の細胞突起であることが確認された (C, F). バーは 30 μ m. (from Harada T, et al: Neuron 26: 533-541, 2000)

ては, ニューロトロフィンが神経細胞の保護作用を持つことが注目されている. 一方で発生のごく初期においては, NGF が p75 と結合することによってアポトーシス

が誘導されることがわかっており, 同じニューロトロフィン受容体でありながら, Trk 受容体と p75 受容体は逆の役割をしていることが推定されている⁴⁶⁾. しかし,

成体における p 75 の働きはこれまで不明であった。
我々は光変性網膜におけるアポトーシスにも p 75 が

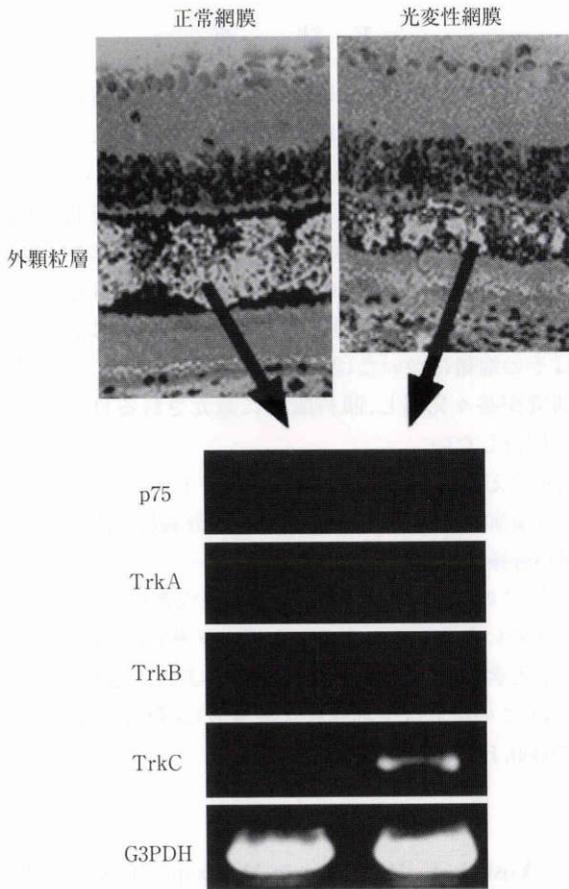


図 25 Laser capture microdissection 法を用いた視細胞の遺伝子発現。

レーザー光を用いて視細胞層のみを採取した後、RT-PCR 法を組み合わせて検討。光変性網膜においては正常網膜にはみられない TrkC の発現がみられる。(Harada T, et al: Neuron 26: 533—541, 2000 より一部改変)

関与するかどうか検討してきた⁴⁷⁾。まず、ラットの光変性網膜におけるニューロトロフィン受容体の遺伝子発現量の変化を定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) の手法を用いて検討した。光変性による視細胞の脱落は生後 21 日からみられ、生後 35 日には視細胞層は正常の約半分の厚さになった。この生後 35 日の時点で、trkC と p 75 が著明に増加していた。次に trkC と p 75 の光変性網膜における蛋白レベルでの発現を免疫染色で検討した。trkC は内網状層に強く発現し、一方 p 75 は視細胞層全体に強く染色された。また、Müller 細胞を特異的に認識するグルタミン合成酵素との二重染色により、trkC は網膜内層側、p 75 は外層側の、いずれも Müller 細胞の細胞突起で増加することが確認された(図 24)。

さらに、trkC と p 75 が視細胞で発現しているかを調べた。網膜切片から視細胞層のみをレーザー光を用いて切り出し (laser capture microdissection)、ニューロトロフィン受容体の遺伝子発現を RT-PCR で検討したところ、正常網膜の視細胞層にはすべてのニューロトロフィン受容体遺伝子が存在しないのに対し、光変性網膜の視細胞では trkC 遺伝子のみが発現していた(図 25)。したがって、光変性網膜では Müller 細胞に加え、視細胞に発現した trkC に対してニューロトロフィンが直接作用する可能性も考えられた。

そこで次に、trkC と p 75 がこの光変性網膜の視細胞に対してどのような役割を果たしているのかを検討した。生後 35 日の光変性網膜では、TUNEL 法により視細胞層に局限してアポトーシスがみられた(図 26)。trk 受容体阻害剤、p 75 中和抗体をそれぞれ生後 32 日の光変性網膜眼に硝子体内注射し、3 日後に網膜のアポトーシスを調べた。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による定量を行ったところ、trk 受容体阻害剤では約

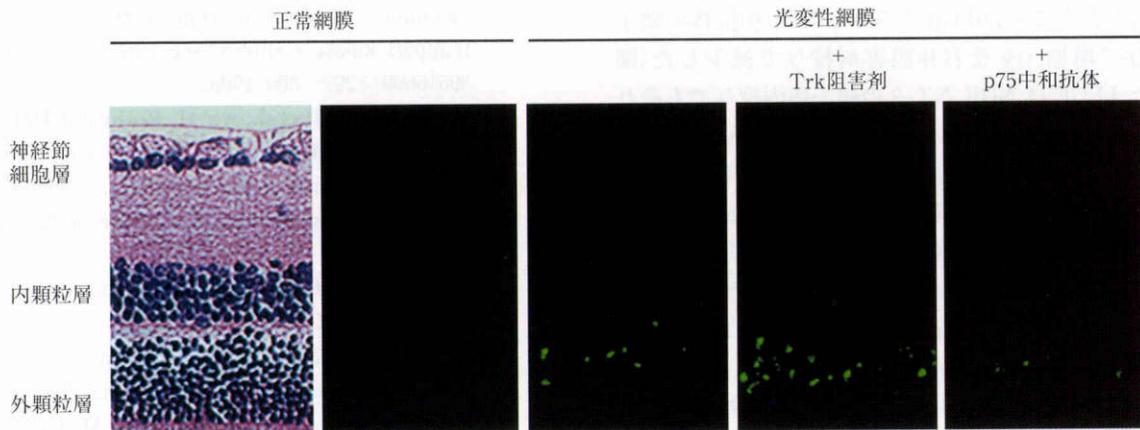


図 26 ニューロトロフィン受容体阻害による視細胞のアポトーシスの変化。

光変性網膜では正常網膜にはみられない視細胞のアポトーシス (TUNEL 陽性細胞) が多数観察される。Trk 受容体阻害剤の眼球内投与によりアポトーシスは増加したが、p 75 受容体の中和抗体投与で逆にアポトーシスは減少した。(原田高幸ら, 神経研究の進歩 44: 394—401, 2000 より)

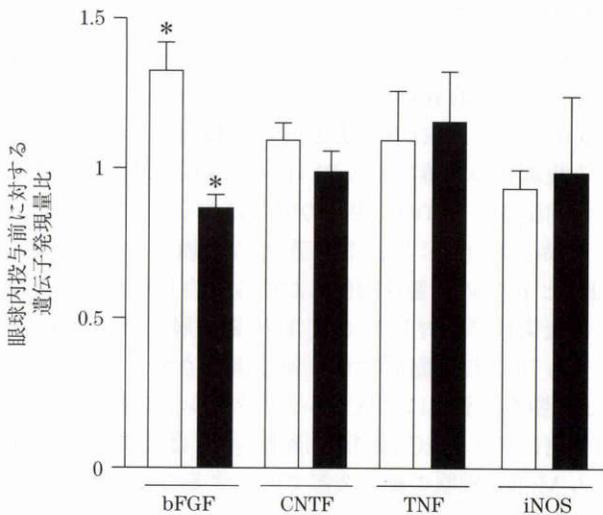


図 27 ニューロトロフィン受容体阻害剤の眼球内投与による各種因子産生能の変化。

p75 中和抗体の眼球内投与で網膜での bFGF 産生量は増加するが, Trk 受容体阻害剤の投与で逆に bFGF 産生量は減少する。* : $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

(from Harada T, et al: *Neuron* 26:533—541, 2000)

□ : p75 中和抗体, ■ : Trk 受容体阻害剤

80% アポトーシスが増加した。逆に p75 中和抗体の投与によりアポトーシスは約 25% 減少し, p75 は光変性網膜においては細胞障害性に働いていることが推定された。さらに, p75 中和抗体の複数回投与により視細胞変性を一部抑制することができた。

以上のように, trkC と p75 は視細胞変性に対して反対の作用を示すことが明らかになったが, その機序として, これらを介して Müller 細胞からの栄養因子あるいは細胞障害性物質の放出量が制御されている可能性が考えられる。

そこで, 各種因子 basic fibroblast growth factor (bFGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), tumor necrosis factor (TNF), inducible nitric oxide synthase (iNOS) について検討したところ, bFGF のみが p75 中和抗体の硝子体内投与で増加, trk 受容体阻害剤投与で減少した(図 27)。また, bFGF は NGF, NT-3 の硝子体内投与でもそれぞれ減少, 増加した。培養 Müller 細胞の実験系では, 細胞内の bFGF 遺伝子発現量および上清中の bFGF 蛋白量の変化は, 硝子体内投与と実験と同様の結果となった。

以上の実験成績は, 光変性網膜では trkC と p75 が Müller 細胞で増加するが, 二次的に bFGF の生産量をコントロールすることで trkC は視細胞保護的に, 逆に p75 は視細胞障害的に働くことを示している。また, ニューロトロフィンがグリア細胞を介した間接作用により, ニューロトロフィン受容体を発現していない神経細胞の生死にも影響を与え得るという新しいメカニズムの存在を示唆している。さらに, p75 へのリガンドの結合を阻害することによって視細胞の変性を一部抑制できた

ことから, p75 を介したアポトーシスの制御が網膜色素変性症を含む網膜変性疾患に有効である可能性が示されたことになる。

V 結 語

近年, 生物学における遺伝子関連研究の伸展はめざましいものがある。医学領域でも遺伝子を主題にした研究はまさに百花繚乱であるし, 臨床医学においても, その恩恵に浴す時代が近づいていると感じざるを得ない。

我々の研究結果も遺伝子の役割は先天異常の病因のみでなく, 視覚器の恒常性の維持にも重要な働きをしていることを明瞭に示すものであった。もちろん, これらの仕事はその端緒についたばかりにすぎない。今後, この領域の研究が益々発展し, 眼科臨床に還元される日がくることを期待したい。

稿を終えるに当たり, 特別講演の機会を与えていただいた特別講演演者選考委員会各位, 眼科学会評議員各位, 眼科学会会員の皆様に感謝いたします。

また, この研究を支えてくれた共同研究者および研究材料の提供をいただいた中西重忠京都大学教授, Glimcher ハーバード大学教授, 川村光毅慶應義塾大学教授に感謝の意を表したい。この研究は文部省科学研究費(課題番号 07457408, 10470360, 12771003)の支援を受けた。

文 献

- 1) Yoshida K, Hu Y, Karin M: I kappa B Kinase alpha is Essential for Development of the Mammalian Cornea and Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(12): 3665—3669, 2000.
- 2) Baeuerle PA, Baltimore D: NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87(1): 13—20, 1996.
- 3) Baldwin AS Jr: The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649—83, 1996.
- 4) Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M: IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex [see comments]. *Nature* 395(6699): 297—300, 1998.
- 5) DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M: A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B [see comments]. *Nature* 388(6642): 548—54, 1997.
- 6) Liu CY, Zhu G, Westerhausen-Larson A, Converse R, Kao CW, Sun TT, et al: Cornea-specific expression of K 12 keratin during mouse development. *Curr Eye Res* 12(11): 963—74, 1993.
- 7) Kurpakus MA, Maniaci MT, Esco M: Expression of keratins K 12, K 4 and K 14 during development of ocular surface epithelium. *Curr Eye Res* 13(11): 805—14, 1994.

- 8) **Wu RL, Chen TT, Sun TT** : Functional importance of an Sp1- and an NFkB-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K 3 keratin gene. *J Biol Chem* 269(45) : 28450—9, 1994.
- 9) **Ma S, Rao L, Freedberg IM, Blumenberg M** : Transcriptional control of K 5, K 6, K 14, and K 17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr* 6(6) : 361—70, 1997.
- 10) **Sakai M, Imaki J, Yoshida K, Ogata A, Matsushima-Hibaya Y, Kuboki Y, et al** : Rat maf related genes : Specific expression in chondrocytes, lens and spinal cord. *Oncogene* 14(6) : 745—50, 1997.
- 11) **Yoshida K, Imaki J, Koyama Y, Harada T, Shinmei Y, Oishi C, et al** : Differential expression of maf-1 and maf-2 genes in the developing rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(12) : 2679—83, 1997.
- 12) **Kataoka K, Noda M, Nishizawa M** : Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* 14(1) : 700—12, 1994.
- 13) **Ogino H, Yasuda K** : Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 280 : 115—118, 1998.
- 14) **Sakai M, Serria SM, Ikeda H, Yoshida K, Nishi S** : Regulation of c-maf gene expression by Pax 6. *Nucleic Acids Res.* in press.
- 15) **Curran T, Franz BR Jr** : Fos and Jun : The AP-1 connection. *Cell* 55 : 395—397, 1988.
- 16) **Yoshida K, Kawamura K, Imaki J** : Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells : Regulation by light/dark cycle. *Neuron* 10(6) : 1049—54, 1993.
- 17) **Yoshida K, Imaki J, Matsuda H, Hagiwara M** : Light-induced CREB phosphorylation and gene expression in rat retinal cells. *J Neurochem* 65(4) : 1499—504, 1995.
- 18) **Ohki K, Yoshida K, Harada T, Takamura M, Matsuda H, Imaki J** : c-fos gene expression in postnatal rat retinas with light/dark cycle. *Vision Res* 36(13) : 1883—6, 1996.
- 19) **Harada T, Imaki J, Ohki K, Ono K, Ohashi T, Matsuda H, et al.** : Cone-associated c-fos gene expression in the light-damaged rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(7) : 1250—5, 1996.
- 20) **Yoshida K, Imaki J, Fujisawa H, Harada T, Ohki K, Matsuda H, et al** : Differential distribution of CaM kinases and induction of c-fos expression by flashing and sustained light in rat retinal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(1) : 174—9, 1996.
- 21) **Yoshida K, Imaki J, Okamoto Y, Iwakabe H, Fujisawa H, Matsuda A, et al** : CREB-induced transcriptional activation depends on mGluR 6 in rod bipolar cells. *Brain Res Mol Brain Res* 57(2) : 241—7, 1998.
- 22) **Sheng M, Thompson WA, Greenberg ME** : CREB a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252 : 1427—1430, 1991.
- 23) **Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, et al** : Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13(8) : 4852—9, 1993.
- 24) **Tsien RW, Hess P, McClesky EW, Rosenberg RL** : Calcium channels : mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann Rev Biophys Biophys Chem* 16 : 265—290, 1987.
- 25) **Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, et al** : Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR 6 gene. *Cell* 80(5) : 757—65, 1995.
- 26) **Imaki J, Yamashita K, Yamakawa A, Yoshida K** : Expression of jun family genes in rat retinal cells : Regulation by light/dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 30(1) : 48—52, 1995.
- 27) **Rehmtulla A, Warwar R, Kumar R, Ji X, Zack DJ, Swaroop A** : The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(1) : 191—5, 1996.
- 28) **Di Polo A, Lerner LE, Farber DB** : Transcriptional activation of the human rod cGMP-phosphodiesterase beta-subunit gene is mediated by an upstream AP-1 element. *Nucleic Acids Res* 25(19) : 3863—7, 1997.
- 29) **Yoshida K, Muraki Y, Ohki K, Harada T, Ohashi T, Matsuda H, et al** : C-fos gene expression in rat retinal cells after focal retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(1) : 251—4, 1995.
- 30) **Harada T, Imaki J, Hagiwara M, Ohki K, Takamura M, Ohashi T, et al** : Phosphorylation of CREB in rat retinal cells after focal retinal injury. *Exp Eye Res* 61(6) : 769—72, 1995.
- 31) **Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al** : The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369(6476) : 156—60, 1994.
- 32) **Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al** : JNK 1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76(6) : 1025—37, 1994.
- 33) **Behrens A, Sibilian M, Wagner, EF** : Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21(3) : 326—9, 1999.

- 34) **Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, et al**: Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276 (5319): 1699—702, 1997.
- 35) **Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, et al**: Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (8): 4663—6, 1998.
- 36) **原田高幸, 原田知加子**: 網膜のグルタミン酸トランスポーター. *神経眼科* 16 (1): 58—61, 1999.
- 37) **Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W**: Structure, expression, and functional analysis of a Na⁽⁺⁾-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (22): 10955—9, 1992.
- 38) **Kanai Y, Hediger MA**: Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter [see comments]. *Nature* 360 (6403): 467—71, 1992.
- 39) **Tanaka K**: Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neurosci Res* 16 (2): 149—53, 1993.
- 40) **Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG**: An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375 (6532): 599—603, 1995.
- 41) **Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG**: Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (8): 4155—60, 1997.
- 42) **Harada T, Harada C, Sekiguchi M, Wada K**: Light-induced retinal degeneration suppresses developmental progression of flip-to-flop alternative splicing in GluR1. *J Neurosci* 18 (9): 3336—43, 1998.
- 43) **LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH**: Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (23): 11249—53, 1992.
- 44) **Fuhrmann S, Kirsch M, Hofmann HD**: Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development *in vitro*. *Development* 121 (8): 2695—706, 1995.
- 45) **原田高幸, 原田知加子, 和田圭司**: 網膜変性とニューロトロフィン. *神経研究の進歩* 44 (3): 394—401, 2000.
- 46) **Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA**: Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383 (6596): 166—8, 1996.
- 47) **Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S, et al**: Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration [see comments]. *Neuron* 26 (2): 533—541, 2000.