## 第97回 日本眼科学会総会 宿題報告

## 眼と分子生物学

## 網膜複合糖質の分子細胞生物学的研究

#### 上原文行

鹿児島大学医学部眼科学教室

共同研究者

鮫島 宗文,内匠 勝秀,鵜木 一彦,中嶋 康幸,柳田 豊子 大久保明子,菅田 昌則,久保志保子,池松 真也,小澤 政之 研究助言者

大庭 紀雄, 村松 喬, Matthew M. LaVail

#### 要 約

網膜複合糖質の生理学的機能,とくに光受容体間基質(interphotoreceptor matrix;IPM)光応答の発現 におけるシアル酸の役割について解明する目的で,分子細胞生物学的研究を行った.N-グリコシド結合型糖鎖 末端にシアル酸を付加する酵素である, α 2,6-sialyltransferase (α 2,6-ST) mRNA 発現について, in situ hybridization 組織化学的に検索した。杆体視細胞優位のラット網膜では、生後16日目以降、視細胞内節で α 2.6-ST mRNA がびまん性に強く検出された. 生後 16 日目に杆体周囲の IPM のシアル酸が増加すると考え られる. 一方, 錐体視細胞優位の成熟リス網膜の視細胞では, a 2,6-ST mRNA が散在性にしか検出されなかっ た. 錐体視細胞周囲の IPM には, シアル酸がないことが示唆される. ラット網膜の杆体周囲の IPM の光応答 は、生後16日目に初めて発現するようになること、錐体周囲のIPMには光応答が発現しないことから、IPM の光応答発現に、杆体周囲の IPM 複合糖質糖鎖末端に存在するシアル酸が重要な役割を果たしている可能性 が高い. 一方, シアル酸を有する IPM は, シアル酸を除去した IPM に比べ電気抵抗が低いことから, シアル 酸のない錐体周囲の IPM に比べ, シアル酸の多い杆体周囲の IPM の電気抵抗は低いことが推定される. 杆体 視細胞に特異的に観察される IPM の光応答は、物質輸送の機能だけでなく、杆体外節の高感度な光受容性に 関係している可能性もある.次に,ラット網膜において,α 2,6-ST mRNA の明順応と暗順応による発現分布 の差が検出された.すなわち、α2,6-ST mRNAは、明順応網膜では内節全体にわたってびまん性に発現する のに対し、暗順応網膜では内節基底部に限局して発現する. 組織化学的に、IPM の光応答第2相として同定さ れる, 光照射によって引き起こされる内節部の IPM 蓄積像は, シアル酸を含有する N-グリコシド結合型複合 糖質の合成の増加に起因することが明らかになった.一方,視細胞内節部の,遊離のリボソームの電子顕微鏡 的観察結果と対照させると、明順応網膜にみられる散在性に分布するリボソームは活性型を、暗順応網膜にみ られる集簇性に分布するリボソームは不活性型を表している可能性が高い.最後に、種々の異なった型の視細 胞変性が進行する過程で, 共通してα2,6-ST遺伝子発現が減少する像を同定した.(日眼会誌 97: 1370-1393, 1993)

キーワード:N-グリコシド結合型複合糖質,シアル酸,α2,6-sialyltransferase,光受容体間基質,光応答

別刷請求先:890 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行 (平成5年7月19日受付,平成5年10月1日改訂受理) Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine. 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan (Received July 19, 1993 and accepted in revised form October 1, 1993)

## Molecular Cell Glycobiology of the Retina

Fumiyuki Uehara

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

#### Abstract

The distribution of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase ( $\alpha$ 2,6-ST) mRNA in the retina was examined using in situ hybridization histochemistry to study the relation of sialic acid to retinal glycoconjugates. In rod-dominant rat retinas, the  $\alpha$ 2,6-ST, which was found to be newly expressed in the photoreceptor inner segments on post-natal day (P) 16, appears to sialylate the rod-associated interphotoreceptor matrix (IPM). In cone-dominant squirrel retinas,  $\alpha 2$ ,6-ST mRNA was sparse, which suggests that cone-associated IPM does not contain sialic acids. The light-response of the IPM first occured between P14 and P16. The IPM around cone photoreceptors did not show the response. These observations suggest that the presence of sialic acids on the termini of sugar chains around rods plays an important role in generating the light response of the IPM. The electrical resistance of the IPM is increased by removing sialic acids from the glycoconjugates of the IPM. The electrical resistance of the rod-associated sialo-IPM may be lower than that of the cone-associated asialo-IPM. The light response of the rod-associated IPM may not only facilitate the transfer of substances between rod photoreceptors and the retinal pigment epithelium, but may also be involved in the generation of the physiological features of rods. A different distribution of a2,6-ST mRNA was detected in light-adapted and dark-adapted rat retinas. The mRNA was diffusely distributed throughout the inner segments in light-adapted retinas, but it was scarse in basal inner segments in darkadapted ones. The second phase of the IPM-light response, histologically detected as accumulation of the IPM around inner segments, may be induced by an increase in the synthesis of N-glycoside linked glycoconjugates containing sialic acids. Comparing this and the electron microscopic examination of free ribosomes in the inner segments, the dispersed and clustered ribosomes correspond to active and inactive types, respectively. A progressive decrease in the mRNA-expression of a2,6-ST was commonly observed in the process of various types of retinal degeneration. (J Jpn Ophthalmol Soc 97:1370 -1393, 1993)

Key words : N-glycoside linked glycoconjugate, Sialic acid,  $\alpha 2,6$ -sialyltransferase, Interphotoreceptor matrix, Light response

#### I 緒 言

複合糖質は、糖を側鎖としてもつ蛋白(糖蛋白)あ るいは脂質(糖脂質)の総称で、単純な寄生微生物か ら高度に分化した動物細胞に至るまで遍く細胞表面に 分布し、種々の重要な生理学的機能に関与している. とくに複合糖質の糖鎖は、細胞内あるいは細胞間の物 質輸送、細胞増殖・分化、卵細胞の受精・着床、腫瘍 細胞の免疫監視機構からの逃避・浸潤・転移、細胞一細 胞あるいは細胞一細胞外基質間の接着、微生物の感染、 細胞保護、食細胞による異常細胞の貪食など、細胞間 の種々の相互作用、識別のための一種のアンテナある いはシグナルとしての役割を果たしている<sup>1)-4)</sup>.最も 身近な例としては、血液型物質があげられる、図1に その模式図を示したが、O型赤血球表面には H型抗原 と呼ばれる糖鎖が分布しており、その糖鎖の末端にさ らに N-アセチルガラクトサミンがついたのが A型, ガラクトースがついたのが B型である.このように、 たった 1 つの糖鎖の違いによって血液型は決定され る<sup>3)</sup>.血液型不適合輸血の際には、このささいな糖鎖の 違いが血清中に存在する凝集素、すなわち、抗 A 抗体 や抗 B 抗体によって認識されて、血液凝固が引き起こ されてしまうわけである.

網膜は,多種類の細胞が複雑な層構造を形成してい る.とくに視細胞と網膜色素上皮細胞との間では,図 2の模式図に示したように,両細胞間の物質輸送・接 着,色素上皮細胞による視細胞外節の貪食など種々の 相互作用が働いており,その機能発現に視細胞表面, あるいは光受容体間基質に分布する複合糖質の糖鎖が 関係している可能性が高い<sup>5)6)</sup>.また,それらの相互作 用が障害されると視細胞が変性する<sup>71</sup>が,その病態に 複合糖質異常が関与している可能性もある.

ところで、レクチンは糖鎖構造を特異的に認識して 結合する性質を有し、様々な組織の複合糖質の研究に 広く用いられている<sup>8)9)</sup>.著者らは、眼球、とくに網膜 の複合糖質の生理学的重要性に注目し、その機能と病



● フコース
 ● ガラクトース
 ● N- アセチルグルコサミン
 ● N- アセチルガラクトサミン

#### 図1 血液型物質の糖鎖構造.

O型の糖鎖末端は、ガラクトースにフコースだけが結 合している.A型では、ガラクトースにフコースのほ かにN-アセチルガラクトサミンが結合している.B型 では、ガラクトースにフコースのほかにさらにガラク トースが結合している。 態を明らかにすべく、今日に至るまで12年間、レクチ ンを用いた基礎的研究を継続してきた<sup>6)10/20</sup>.一方、こ れらの研究結果を基礎にして、1991年夏から1993年 6月の第97回日本眼科学会総会宿題報告を目標にし て、網膜複合糖質の分子細胞生物学的研究を進めてき た.本研究報告では、最初に著者らの網膜複合糖質の レクチン組織化学的研究の流れについて概説し、次に、 最近2年間の分子細胞生物学的研究結果、とくに、網 膜光受容体間基質の光応答に注目した研究結果につい て報告したい.

# II 網膜複合糖質のレクチン 組織化学的研究

1970年代にレクチンを用いた網膜複合糖質の研究 が開始され、当初は主として網膜色素上皮細胞による 視細胞外節の貪食機能に関連して, 色素上皮細胞突起 表面の糖鎖や、ロドプシン糖鎖のマンノース残基に注 目した研究が行われた21)~24). 著者らも 1981 年から眼 組織のレクチン組織化学的研究を開始し,同年夏, peanut agglutinin (PNA)<sup>25)</sup>が,錐体視細胞内節・外節表 面に選択的に結合することを発見した10).続いて米国 の研究グループも、PNA の錐体選択的結合性につい て報告し26)、その後の多くの研究者による追試によっ て、PNA が錐体視細胞の選択的マーカーとなること が確認されるとともに、PNA は錐体内節・外節表面だ けでなく、その周囲の光受容体間基質(interphotoreceptor matrix; IPM)に結合することも明らかになっ た16)17)27). 一方, 杆体内節・外節表面およびその周囲の IPM には、シアル酸あるいは N-アセチルグルコサミ



図2 複合糖質を介した視細胞と網膜色素上皮細胞との間の主な相互作用. 視細胞と色素上皮細胞との間では、光受容体間ビタミンA結合蛋白によるビタミンA の運搬など、種々の代謝物質の輸送が行われる. 視細胞と色素上皮細胞とは、光受容 体間基質を介して接着している. 色素上皮細胞は、視細胞外筋表面の糖鎖構造を認識 して貪食する.

垂直性 Heterogeneity 水平性 Heterogeneity



図3 光受容体間基質の2種類の heterogeneity. 光受容体間基質は、分布する複合糖質の糖鎖構造の違いによって、錐体と杆体との間 で外境界膜に垂直に(垂直性 heterogeneity)、視細胞内節・外節の部位によって外境 界膜に平行に(水平性 heterogeneity)分断されている. PNA: peanut agglutinin WGA: wheat germ agglutinin RCA-1: *Ricinus communis* agglutinin-1

ン (GlcNAc) を認識するレクチンである wheat germ agglutinin (WGA)<sup>28)</sup>が選択的に結合することが判明した<sup>13)17)29)</sup>. さらに著者らは、上記の錐体と杆体周囲のレクチン染色性の差は、それぞれの周囲に存在する複合糖質の糖鎖末端のシアル酸の含有量の違いによって生じる可能性が高いことを初めて指摘した<sup>13)</sup>. この考え方は、現在多くの研究者によって支持されている<sup>30)~33)</sup>.

このように、視細胞内節・外節表面および周囲の IPM 複合糖質の組成は、錐体と杆体とで異なっており、 錐体と杆体の間は外境界膜に対して垂直方向に分断さ れている. すなわち, IPM は網膜下腔全体にわたって 均一に分布するのではなく, IPM 組成の違いによる垂 直性の heterogeneity が存在するといえる. 一方, IPM の組成は、視細胞内節・外節の先端部~基底部の各部 位によっても異なることが報告されている.すなわち、 IPM は外境界膜に平行な層構造(水平性の heterogeneity)を成すことが、コロイド鉄染色などの種々の 組織化学的手法を用いて同定されている34)~37).これら の2種類の IPM の heterogeneity の模式図を図3に 示したが,異なる方向性を持つ IPM の垂直性と水平 性の heterogeneity が,互いにどのような関係にある かという点に関しては、それぞれ専門とする研究者の 視点が異なることもあって、しばらくの間は不明で あった.また,両者とも形態学的には安定な,静的な細胞 外構造基質としてしかとらえられてはいなかった。

著者は, 鹿児島大学において IPM の垂直性 heterogeneity の研究に従事した後, IPM の水平性 heterogeneity の研究を専門とする、米国カリフォルニア大 学サンフランシスコ校の MM LaVail 教授の研究室で 研究する機会を得た. そこで, 垂直性 heterogeneity と 水平性 heterogeneity の2つの視点から同時に IPM を眺めることによって、両方の heterogeneity の概念 を融合することに成功した. すなわち, まず, IPM は 静的で安定した物質であるという概念の枠を越えて、 その分布が明・暗の光条件の違いに応答して変化する ことをラット網膜で発見した38). さらに、その変化する 成分は、主として杆体周囲 IPM の N-グリコシド結合 型複合糖質成分であり, 暗順応網膜では視細胞外節部 全体から内節先端部にかけてびまん性に分布するのに 対し,明順応網膜では視細胞外節先端部および外節基 底部から内節部にかけてそれぞれ帯状に分布すること を明らかにした<sup>39)</sup>. これらの発見を基盤として、IPM の複合糖質の垂直性と水平性の heterogeneity は、次 のように統一的な概念で説明できる. すなわち, 錐体 と杆体の間は糖鎖構造の違いによって垂直にしき られており、まず、普遍的に IPM の垂直性 heterogeneity が存在する.そして,それを形成する2つの 要素の1つである杆体周囲 IPM のうちの、N-グリコ シド結合型複合糖質成分にのみ水平性の heterogeneity は観察され、かつ、その形が光に応答して変 化するのである. これによって IPM の heterogeneity



図4 光受容体間基質の光応答(2種類のheterogeneityの統合). 錐体と杆体の間は、外境界膜に垂直に分断されている. 錐体周囲の光受容体間基質の 分布は明・暗で変化しないが、杆体周囲の光受容体間基質は、外境界膜に平行な水平 性の帯状分布として同定され、その位置が明・暗で変化する.

は、図4の模式図のように統合的に概念化された.

さらに、杆体周囲 IPM の N-グリコシド結合型複合 糖質成分の分布が明・暗で変化するのに対し、O-グリ コシド結合型複合糖質成分は,錐体周囲 IPM,杆体周 囲 IPM を問わず、明・暗の光環境が異なってもほとん ど変化しない<sup>39)</sup>ことが判明した. このように, IPM の N-グリコシド結合型とO-グリコシド結合型複合糖質 成分の光に対する反応性の違いから、両者はそれぞれ 異なった生理学的機能を分担している可能性が高い. ここで N-グリコシド結合型と O-グリコシド結合型 の一般的な特徴について簡単に述べておく、糖蛋白は 糖と蛋白が共有結合しており, 糖-ペプチド結合の種 類に基づいて、N-グリコシド結合型(血清型)とO-グ リコシド結合型(ムチン型)とに分類される. N-グリ コシド結合型は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc) がアスパラギンのアミノ基に結合したもので、O-グリ コシド結合型は N-アセチルガラクトサミン (Gal-NAc) あるいはキシロースがセリンまたはスレオニン の水酸基に結合したものである. N-グリコシド結合型 糖鎖を認識するレクチンには、ガラクトース(Gal)β1, 4 GlcNAc に特異的な Ricinus communis agglutinin-1 (RCA-1)40)がある。一方, O-グリコシド結合型糖鎖 を認識するレクチンには、Gal β 1,3 GalNAc に特異的 な PNA がある25).

Neuraminidase によって引き起こされた網膜剝離 部の IPM を, PNA と, RCA-1 を用いてレクチン組織 化学的に検索したところ, それぞれのレクチンが結合 する IPM 成分の有する機能が互いに異なることを示 唆する結果が得られた<sup>®</sup>. すなわち, 以下のように IPM の複合糖質は大きく 2 つに分類できることが判明し た.

1. PNA で認識される成分 (0-グリコシド結合型複 合糖質成分 ; ムチン型成分)

光に対して安定で、網膜剝離部の網膜下腔を視細胞 内節先端部と色素上皮細胞突起表面とを紐状に結ぶ形 で同定される.静的な細胞外構造基質として視細胞内 節・外節,色素上皮細胞の構造維持,および視細胞内 節先端部(色素上皮細胞に貪食される外節先端部では ない)と色素上皮細胞突起表面との間の接着に関与し ているものと推定される.共同研究者の鮫島は,この ムチン型 IPM の分布について,電子顕微鏡的に同定 した結果を初めて報告した<sup>17)</sup>.また,この成分は,生化 学的にはプロテオグリカンの一種で,O-グリコシド結 合型糖鎖の他にコンドロイチン硫酸を多く含有し<sup>41)</sup>, 電子顕微鏡的には網膜下腔において網目状構造物とし て同定される成分に対応するものと考えられる<sup>17)</sup>.

 RCA-1 で認識される成分(N-グリコシド結合型 複合糖質成分;血清型成分)

シアル酸を含有する杆体周囲 IPM の成分は,光に 応答してその分布が変化する<sup>39)</sup>. 網膜剝離部の網膜下 腔にびまん性に,視細胞から色素上皮細胞に向かうに つれてその濃度が減弱する形で同定される. ビタミン A を運搬する蛋白(interphotoreceptor retinol binding protein; IRBP) も N-グリコシド結合型複合糖質 に属しており<sup>42)</sup>,かつ著者らは,明・暗によってその分 布が変化することを IRBP に対する抗体を用いて免 疫組織化学的に同定している<sup>38)</sup>. 視細胞と色素上皮細 胞間の種々の物質輸送の機能に関係している可能性が 高い. 電子顕微鏡的には網膜下腔において顆粒状物質 として同定される成分に対応すると考えられる. すな

#### 平成5年12月10日



図5 光受容体間基質複合糖質の機能に関する模式図. 光受容体間基質のO-glycoside 結合型複合糖質成分 の網目状構造によって,視細胞と網膜色素上皮細胞 とは結ばれている.その間を,N-glycoside 結合型の 顆粒状の複合糖質成分が,光刺激に応答して外節か ら色素上皮細胞へ向かって移動する.

わち,網目状構造物が明・暗で変化しないのに対し, この顆粒状物質は,暗順応下では視細胞外節周囲にび まん性に分布し,明順応下では色素上皮細胞突起表面 に集積することを,共同研究者の鮫島が第95回日本眼 科学会総会で報告した.

以上をまとめると、O-グリコシド結合型複合糖質成 分が,視細胞外節・内節と色素上皮細胞突起の間の網 膜下腔の細胞外構造基質としての網目状構造物を形成 し、その間,あるいは上を、光に応答して IRBP など の N-グリコシド結合型複合糖質成分である顆粒状物 質がすべるようにして動き,視細胞と色素上皮細胞の 間の物質交換を行っているのではないかと推定される (図 5).

本宿題報告においては、まず、光に応答してその分 布が変化する IPM の、N-グリコシド結合型複合糖質 成分の糖鎖末端のシアル酸に注目して、分子細胞生物 学的に IPM 光応答の発現機序の一端を明らかにした 結果について報告する.次に、シアル酸と網膜変性の 関係など、IPM 光応答以外の網膜複合糖質の重要性を 示唆する研究結果についていくつか報告する.

## III 網膜複合糖質の分子細胞 生物学的研究手法

1. はじめに

遺伝子は蛋白のアミノ酸配列を規定する。したがっ て,シアル酸を初めとする複合糖質の糖鎖部分は遺伝 子の一次産物ではないことから, 分子生物学的手法を 用いて直接検索することはできない. しかし、糖鎖は 酵素蛋白である種々の glycosyltransferase によって 形成されるので,本酵素遺伝子発現について分子生物 学的手法を用いて検索することによって,間接的に糖 鎖に関する分子生物学的情報を得ることができる、N-グリコシド結合型糖鎖の形成は、シアル酸あるいはフ コースが糖鎖末端に付加されることによって終了す る<sup>3)</sup>. したがって, IPM の光応答に関与していると考え られるシアル酸を含有する N-グリコシド結合型複合 糖質の発現に関する情報は、その生成の最終段階で働 く, N-グリコシド結合型糖鎖の末端にシアル酸を付加 する酵素, すなわち, Galβ 1,4 GlcNAc α 2.6(あるい は a 2,3)-sialyltransferase 遺伝子発現について検索 することによって得られることが期待される. 幸いに してラットの Gal $\beta$ 1, GlcNAc  $\alpha$ 2,6-sialvltransferase (α 2,6-ST)の cDNA は既にクローニングされ、塩基配 列も決定されている<sup>43)</sup>. 一方, 著者らは IPM の光応答 の研究に主にラットを用いてきた38)39)ことからも、今 回の分子細胞生物学的研究のための実験動物として, 主としてラットを用いると都合がよいと考えた.

網膜は多種類の細胞が複雑な層構造を形成している ので,網膜全体の遺伝子発現について,例えば Northern hybridization 法を用いて解析しても, IPM を産 生する視細胞層に限局した mRNA 発現の情報のみを 得ることは難しいであろう. In situ hybridization 組 織化学法を用いて組織切片中の mRNA を検出する方 法は,分子生物学と組織学の両分野をつなぐ新しい技 術として注目を浴びている<sup>44)</sup>.本法を用いれば,視細 胞層単独の $\alpha$  2,6-ST を初めとする種々の蛋白の mRNA を検出することができるであろうと期待され る.

2. In situ hybridization 組織化学の実験方法

網膜,とくに視細胞層(内節)のmRNA分布を正確 に検出するために,凍結組織切片よりも形態学的に優 れた結果の得られるパラフィン包埋組織切片を用いる ことにした.一方,cDNA プローブや oligonucleotide プローブよりも安定な hybridization の結果が得られ る RNA プローブを,比較的短時間に実験結果が得ら れることを期待して,非放射性の digoxigenin 標識し て用いることにした.

1) α 2,6-sialyltransferase の cRNA ブローブの 調 整法

成熟 Wistar ラットの 肝臓から guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 抽出法45)を用いて RNA を分離し, oligo dT セルロースカラムを通して poly A RNA を精製し、逆転写酵素を用いて c-DNA を合成した. これを鋳型 DNA として, α2,6-sialyltransferase (α2,6-ST)<sup>43</sup>に特異的な一対の23塩基 のプライマー (5'-CCTGCAGCCCCAGAGGGAT-TAGC-3'; 5'-GGGTGCCTGGCTAGGTACTCAAC-3') と Ampli Taq DNA polymeraseを用いて polymerase chain reaction (PCR)<sup>46)</sup>を行った、PCR 試料を1.5% アガロースゲルで電気泳動し, DEAE セ ルロース膜を用いて本酵素の DNA を分離した. 全長 DNA をまず Bluescript II KS(+) (Toyobo)の Sma I 切断部位に組み込み, JM 109 competent 細胞にとり こませた. Dideoxy 法47)によって DNA のシークエン スを決定し,目的とする α 2,6-ST の塩基配列43)を有す ることを確認した. Pst Iと Bgl II で消化して得られ た a 2,6-ST DNA 断片 (238 bp; 324-561) を, Bluescript II KS(+)の Pst I-BamH I 切断部位に組み込 み, subcloning した. Xba I でこの鋳型 DNA を直線 化し、T3 RNA polymerase を用いて antisense の RNA ブローブを合成した. また, EcoRV で鋳型 DNA を直線化し、T7RNA polymerase を用いて sense の RNA プローブを合成した.一方,これらの RNA プ ローブは、合成と同時に digoxigenin-UTP をとりこ ませることによって digoxigenin 標識した. さらに過 水分解処理を行い、プローブの長さは約120bに調整 した.

2) Peripherin/rdsのcRNA プローブの調整法

ゥシ網膜から 1)と同様の方法で poly A RNA を精 製し, cDNA を合成した. これを鋳型 DNA として, peripherin/rds<sup>48)</sup>に特異的な一対の 21 塩基と 19 塩基 の プ ラ イ マー (5'-TTTGACCAGAAGAAGCGG-GTC-3':5'-TTCCAGGTCTCCGGCACGC-3')を用 いて PCR を行い,電気泳動的に peripherin/rdsの cDNA を分離した.目的とする peripherin/rdsの塩基 配列を有することを確認した後,Pst I 断片(272 bp) を Bluescript II KS(+)の Pst I 切断部位に組み込 み, subcloning した. BamH I でこの鋳型 DNA を直 線化し、T 3 RNA polymerase を用いて antisense の RNA プローブを合成, EcoR I で鋳型 DNA を直線化 し、T 7 RNA polymerase を用いて sense の RNA プ ローブを合成, digoxigenin 標識した. プローブの長さ は、 $\alpha$  2,6-ST と同様に約 120 b に調整した.

3) α (1,3/1,4) fucosyltransferase (FT)<sup>49)</sup>の cRNA プローブの調整法

John B. Lowe 博士から贈られた FT cDNA の Pst I 断片 (279 bp) を Bluescript II KS (+) の Pst I 切 断部位に組み込み, subcloning した. BamH I でこの 鋳型 DNA を直線化し, T 3 RNA polymerase を用い て antisense の RNA ブローブを合成, EcoR V で鋳型 DNA を直線化し, T 7 RNA polymerase を用いて sense の RNA ブローブを合成, digoxigenin 標識し た. ブローブの長さは約 120 b に調整した.

4) In situ hybridization 組織化学の方法

4% paraformaldehyde/0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理燐酸緩衝液 (PBS), あるいは 0.5% glutaraldehyde, 4 % paraformaldehyde/ DEPC 処理 PBS を用いて、それぞれの実験条件下(後 述) でラットあるいはマウスを灌流固定した. 眼球を 摘出し, 灌流に使用した固定液でさらに一夜浸漬固定 した後, DEPC 処理 PBS に一夜浸漬, エタノール脱 水,パラフィン包埋した.厚さ8µmの光学顕微鏡用組 織切片を作製,脱パラフィン後, proteinase K[20 µg/ ml DEPC 処理 PBS (0.68 U/ml PBS)] を用いて 37℃ で消化処理した(4% paraformaldehyde 固定標本:平 均10分間;0.5% glutaraldehyde 含有固定標本:平 均40分間;なお,予備実験的に種々の消化時間につい ても比較した). 組織切片を DEPC 処理 PBS で洗浄 後, さらに 5 分間, 4% paraformaldehyde/DEPC 処理 PBS で後固定した. Glycine 含有 DEPC 処理 PBS (2 mg/ml) で洗浄後, 0.5% 無水酢酸含有0.1M triethanolamine 溶液で10分間処理,2倍濃縮標準クエン酸 塩 (2 XSSC) 洗浄, エタノール脱水した. Antisense, あるいは sense の digoxigenin 標識 RNA プローブ (1 µg/ml) を含む hybridization 溶液 [50% 脱イオン化 formamide, Denhardt 溶液, E. coli tRNA(1 mg/ml), 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM EDTA pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% dextran sulfate, RNase 阻害剤 (60 µl/ml)]を,各組織切片に 60 µl ずつのせ,さらに カバーグラスをかぶせ,湿潤箱内で45℃,36時間,ハ イブリダイズさせた.次に、50% formamide/2 xSCC で45℃, 1時間洗浄, RNAase (20µg/ml 10 mM



図 6 **Digoxigenin 標識プローブを**用いた in situ hybridization の組織化学の原理. Digoxigenin (Dig)標識した cRNA ブローブが,相補的な塩基配列を有する細胞質中 の mRNA にハイブリダイズする.ブローブの Dig 部分に,alkaline phosphatase (AP)標識した抗 Dig 抗体が結合する.AP 発色によって間接的に,目的とする mRNA の分布が検出される.

Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) で 37℃, 30 分間 消化した後, 2 xSSC, 0.5 xSSC, 0.1 xSCC で 50°C, 各30分間ずつ洗浄した.1%ブロッキング緩衝液 (Boehringer Mannheim) に室温で 30 分間浸漬した 後, alkaline phosphatase (AP) 標識抗 digoxigenin 抗体 (Boehringer Mannheim; 4 µl/ml 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) を室温で2時間反応さ せ, 0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaClで3回液 を交換しながら1時間洗浄した. AP発色液[nitroblue tetrazolium salt (0.34 mg/ml), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidinium salt (0.18 mg/ml), 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>]を室温で12時間反応させ、antisense および sense プローブの結合分布について光学顕微鏡を用い て観察,比較した.以上の digoxigenin 標識プローブを 用いた in situ hybridization 組織化学の原理について まとめた模式図を図6に示した.

### 3. In situ hybridization 組織化学に用いる組織固 定液の検討

上記の in situ hybridization 組織化学を進める過程 で、いくつか実験方法上の問題点に遭遇した. In situ hybridization 組織化学は、今後ますます、眼科領域の 基礎的研究にも利用されていくことが予想されるの で、最初に筆者らの経験で得られた実験手技上の改良 点<sup>50)</sup>について紹介しておきたい.

In situ hybridization 組織化学用の固定液として は、4% paraformaldehyde/PBS が広く用いられてい る. しかしながら, 著者らがいく種類かの組織固定液 について比較,検討した結果,パラフィン包埋した網 膜組織を検索する目的のためには, glutaraldehyde を 0.5%の濃度で4% paraformaldehyde/PBSに加え て用いた方が優れていることが判明した50)、すなわち、 4% paraformaldehyde/PBS 単独では、0.5% glutaraldehyde を加えた場合に比べ,組織標本作製の 過程において網膜剝離が起こる頻度が高かった。正常 網膜を検索する場合には,網膜剝離が起こっても視細 胞外節が長いために内節部の hybridization の信号の 判別に支障は来さなかった.しかし、外節・内節が変 性短縮した視細胞変性網膜では,組織標本作製の過程 で網膜剝離に引き続いて外節が、あるものでは内節ま で所々脱落してしまい, hybridization の信号の判別が 難しい傾向にあった.

一方、十分な mRNA の信号を得るためには、組織切 片を proteinase K で消化して mRNA の周囲の蛋白 を除去する必要がある。その mRNA 露出のための proteinase K 消化の条件設定が、4% paraformaldehyde/PBS 固定標本では困難であった。すなわち、 proteinase K 消化の時間が短いと mRNA の露出が不 十分なだけでなく、逆に少しでも長すぎると mRNA そのものが蛋白とともに除去されてしまう傾向にあっ

た. Proteinase K 消化時間を水平軸に, hybridization の信号の強さを縦軸にプロットして得られる曲線が山 型となるために、曲線の頂点にあたる最適と考えられ る酵素処理の時間設定が、個々の組織標本の微妙な固 定条件の違いから困難であった。それに対し、0.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde/PBS 固定で は、proteinase K 消化時間を 4% paraformaldehyde/ PBS 単独固定に比べ2倍以上に長くしないといけな いという欠点はあるが、一定時間以上消化すると、し ばらくの間 hybridization の信号の強さがプラトーに 達するために、最適な条件設定が容易で、組織切片間 のばらつきもほとんど認められなかった.また, 2.5~5.0%の glutaraldehyde/PBS 単独の固定液を用 いた場合でも、0.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde/PBS 固定とほぼ同様の結果が得られた.この 場合. glutaraldehvde/PBSを用いた灌流固定に先 立って、ラットをまず PBS で1,2分間灌流する必要 があるが、paraformaldehydeの粉末を加熱, 溶解させ

経節細胞層. バーは20μm

pH を調整する手間が省略できることは大きな利点で ある。

以上の理由から, 著者らは glutaraldehyde を混合し た paraformaldehyde 液, あるいは, glutaraldehyde 単独液を in situ hybridization 組織化学用の固定液と して用いることを推奨したい.

4. 本研究で用いた in situ hybridization 組織化学 実験系の特異性

次に、本研究で用いた in situ hybridization 組織化 学実験系の特異性について考察しておきたい.

成熟ラットでは、シアル酸を含有する N-グリコシド 結合型複合糖質は、神経節細胞から視細胞に至るまで ほぼ網膜の全層に分布することをレクチン組織化学的 に確認している<sup>13)</sup>.本研究において Gal $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6-sialyltransferase ( $\alpha$  2,6-ST) mRNA の分布は、 成熟ラット網膜では視細胞層だけでなく、神経節細胞 層、内・外顆粒層にも観察された(図 7 a).ゆえに、 これらのすべての細胞で  $\alpha$  2,6-ST は産生され、N-グ



図7 種々の cRNA プローブを用いたラット網膜の in situ hybridization の組織化学像. a:  $\alpha$  2,6-sialyltransferase mRNA に相補的な cRNA ブローブは, 視細胞内節, 外顆粒層, 内顆粒層, 神経節細胞層にハイブリダイズしている. b: peripherin/rds mRNA に相補的な cRNA ブローブは, 視細胞内節と, 外顆粒層外境界膜寄りにハイブリダイズしている. c:  $\alpha$  (1,3/1,4)-fucosyltransferase mRNA に相補的な cRNA ブローブは, 網膜のどの層にもハイブリダイズしない. d:  $\alpha$  (1,3/1,4)-fucosyltransferase mRNA と同じ塩基配列を有する sense の cRNA ブローブも, 網膜のどの層にもハイブリダイズしない. OS: 視細胞外節 IS: 視細胞内節 ONL: 外顆粒層 INL: 内顆粒層 IPL: 内網状層 GC: 神 リコシド結合型糖鎖の末端にシアル酸が付加され,その N-グリコシド結合型複合糖質は網膜のほぼ全層に 分布するのであろうと考えられる.また,成熟視細胞 においては内節部に  $\alpha$  2,6-ST の mRNA がとくに強 く 発現していたが,これはオプシンや IRBP の mRNA が視細胞内節部に分布する報告<sup>51)52)</sup>と一致し ている.視細胞内節にリボソームが豊富に局在するこ とから,視細胞の核および細胞質が分布する外顆粒層 よりも内節の方にこれらの mRNA の分布が強く検出 されたものと考えられる. $\alpha$  2,6-ST はリボソームで合 成された後,同じく内節に局在するゴルジ体まで輸送 され,Gal $\beta$  1,4 GlcNAc にシアル酸を転移する機能を 発現するのであろう.

ところで, peripherin/rds は, 視細胞外節円盤膜にの み分布することが免疫組織化学的に同定されてい る<sup>53)</sup>.本研究において, peripherin/rdsのmRNA は  $\alpha$  2,6-ST とは異なり, 確かに視細胞, とくに内節部に 限局して発現することが確認された(図7b). オプシ ン, IRBP や  $\alpha$  2,6-ST と同様に, 外顆粒層よりもリボ ソームが豊富に局在する視細胞内節部に強く検出され たのであろう.

一方,  $\alpha$  (1,3/1,4) fucosyltransferase は成熟 ラット 網膜には分布しない<sup>49)</sup>.本研究において,この mRNA はラット網膜で発現しないことが確認された(図7c).

さらに、目的とする mRNA にほとんど相補性のな い sense RNA ブローブをハイブリダイズさせて得ら れる組織切片の信号は微弱でしかなかった(図7d). したがって、本実験方法のハイブリダイズと洗浄の条 件下では、antisense RNA ブローブは相補性の高い特 異的な mRNA にのみ結合し、相補性の低い mRNA への結合は解離しているものとみなすことができる.

以上の如く,今回用いたすべての antisense RNA プ ローブは,それぞれの組織化学的所見から期待される ような,あるいは予盾しない mRNA の発現分布を示 したことから,本研究で用いた in situ hybridization 組織化学実験系の特異性は高いものと判定される.

## IV 光受容体間基質(IPM)光応答の 分子細胞生物学的研究

IPM 光応答発現とシアル酸:生後早期の α 2,
 6-sialyltransferase mRNA 発現の変化<sup>54)</sup>

ラット IPM の N-グリコシド結合型複合糖質成分の 光応答は、シアル酸を糖鎖末端に含有すると考えられ る杆体視細胞の表面のみで観察されること<sup>39)</sup>, neuraminidase を作用させると消失すること55)から、その発 現にシアル酸が重要な役割を果たしている可能性があ る. 一方、 ラットの IPM の光応答は生後 16 日前後に 初めて発現するようになる56). その時期に一致して IPM のレクチン染色性が変化する. すなわち, 生後16 日前後に、杆体周囲のIPMに対する、Gal β 1.4 GlcNAcを認識するレクチンである RCA-1の結合性 が減弱するとともに、シアル酸を認識する WGA の結 合性が逆に増大する19). その機序として、杆体周囲の IPM 複合糖質糖鎖末端のシアル酸が増加することが 考えられる、そこで、 $\alpha$  2.6-sialyltransferase ( $\alpha$  2, 6-ST)のmRNAのラット視細胞層における発現が、 生後16日前後に増加しているかどうか検索した.すな わち,生後1日目から6週齢までのWistar ラットを 明順応下に灌流固定し、網膜の α 2.6-ST の mRNA 発 現分布について検索した.

生後1日目においては、視細胞層から内顆粒層まで の分化・形成はないが、神経節細胞は既に形成されて おり、そこには $\alpha$ 2,6-ST の mRNA が発現している像 が観察された。生後8~10日目には視細胞内節が、 12~14日目には視細胞外節も同定できたが、まだ視細 胞内節において $\alpha$ 2,6-ST の mRNA は発現していな かった。当初の予想どおり、生後16日目になって初め て、視細胞内節部に強く $\alpha$ 2,6-ST の mRNA が発現し ている像が観察された<sup>54)</sup>.

生後16日前後に,視細胞層のN-グリコシド結合型 複合糖質のGal $\beta$ 1,4 GlcNAcにシアル酸が分布する ようになるために,RCA-1の結合部位がマスクされ, その視細胞層への結合性が減弱するものと考えられ る.成熟網膜では,組織切片をあらかじめ neuraminidase 処理することによって視細胞層へのRCA-1 の結合性が増大する<sup>13)39)</sup>ことからも,生後16日目以降 は視細胞層のN-グリコシド結合型複合糖質糖鎖末端 にシアル酸が存在していることが示唆される.

ラット網膜は、杆体視細胞が 98%を占めている<sup>57)</sup>こ とから、本研究で  $\alpha$  2,6-ST の mRNA が同定された視 細胞のほとんどは、杆体視細胞であると考えられる.  $\alpha$  2,6-ST の mRNA は、これまでのレクチン組織化学 的研究から、錐体視細胞には発現しないと予想される が、それを確かめるために、錐体視細胞が 95% 以上を 占めるリス網膜<sup>58)</sup>について、in situ hybridization 組織 化学的に検索してみた.  $\alpha$  2,6-ST の mRNA は、神経 節細胞層には強く、びまん性に発現していたが、視細 胞層には弱く、散在性にしか発現していないことが確 認された. したがって, 錐体には  $\alpha$  2,6-ST の mRNA は発現しないものと結論できる.

参考のために、peripherin/rds mRNA の発現につい ても、ラットとリスの網膜を比較した. この場合には、  $\alpha$  2,6-ST とは異なり、両種の視細胞内節にびまん性の mRNA 発現が観察された<sup>59)</sup>. 外節円盤膜は、杆体、錐 体ともに共通の peripherin/rds 蛋白によって構成さ れているものと考えられる.

以上の研究によって、IPM の光応答が初めて発現す るようになる時期に一致して、杆体視細胞で  $\alpha$  2,6-ST の mRNA が強く発現することが明らかになったこと から、杆体周囲 IPM の光応答の発現にシアル酸が重 要な役割を果たしている可能性が、以前にもまして高 くなったといえよう.

ところで、N-グリコシド結合型糖鎖の core 部分の 糖鎖を形成する $\beta$ 1,4 galactosyltransferase の発現 は、組織特異性はなく、その promoter 部にはいわゆる house keeping 遺伝子にみられる、生体に広範に分布 する転写因子の結合部だけがあるのに対し、糖鎖末端 に転移する  $\alpha$  2,6-ST を含む terminal glycosyltransferase は、組織特異的に、あるいは細胞分化の特定の 時期に発現することが多いと報告されている<sup>60</sup>. そし てその発現には、promoter 部の転写因子結合部の特 異性が関与しているのではないかと考えられている。 上記の研究で明らかになったように、網膜では $\alpha$ 2, 6-ST の mRNA がまず神経節細胞に発現し、次に杆体 視細胞に発現するようになるが、錐体視細胞には成熟 しても発現することはない、この細胞分化における  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の発現の調節機構については,  $\alpha$  2,6-ST 遺伝子の promoter 部,あるいは enhancer などを解析することによって、今後、明らかにされて いくであろう.

2. 2相性 IPM 光応答発現とシアル酸:明・暗による α 2,6-sialyltransferase mRNA 発現の変化

IPM 光応答の明順応部分について詳細に検討した ところ,2相性の成分に分けられることが先に判明し た.すなわち,まず第1相として,光刺激に迅速に応 答して IPM が外節先端部および基底部(内節先端部 を含む)に分離する.光照射の時間がのびると,第2 相として,外節周囲の IPM は両端に分離したままで, 視細胞内節の基底部周囲まで IPM が分布,集積する<sup>61)</sup> (図 8).この第2相目の光応答は,IPM の単なる分布 の変化を表しているのか,あるいは内節におけるシア ル酸を含有する N-グリコシド結合型複合糖質の産生 が増加し,内節周囲へ蓄積しているのか,2つの可能 性が考えられる.そこで,明・暗の光条件の違いが  $\alpha$  2, 6-sialyltransferase ( $\alpha$  2,6-ST)の mRNA のラット視 細胞層における発現に及ぼす影響について検索するこ とにした.

 $6 \sim 8$  週齢の Wistar ラットを,以下の実験条件で 暗順応,あるいは明順応下に灌流固定し,IIIに記載し た方法で網膜の  $\alpha$  2,6-ST の mRNA 発現分布につい て検索した.

まず、 ラットを8 匹ずつ4 つの群に分け、6 時間(7 PM~1 AM)、12 時間(7 PM~7 AM)、18 時間(7 PM ~1 PM)、24 時間(7 PM~7 PM)ずつ暗順応させた



図8 2相性の光受容体間基質光応答の模式図. 光応答第1相:光刺激に応答して,杆体周囲の光受容体間基質(IPM)は外節先端部 と基底部に分離する.光応答第2相:光刺激に緩徐に応答して,IPMは視細胞内節基 底部まで分布するようになる.錐体周囲の IPM は明・暗で変化しない. 平成5年12月10日

後, それぞれ1AM, 7AM, 1PM, 7PM において5, 10, 30, 60, 120, 180 分間明順応させ, ラットを灌流 固定した. 一方, それぞれの群(時間)の明順応開始 5分前および明順応終了5分後に, 暗順応を継続させ たラットを, 眼球を遮光したままの状態で灌流固定し た.

次に、 ラットを8匹ずつ4つの群に分け、18時間(7 AM~1AM)、24時間(7 AM~7 AM)、6時間(7 AM ~1 PM)、12時間(7 AM~7 PM)ずつ明順応させた 後、それぞれ1 AM、7 AM、1 PM、7 PM において5、 10、30、60、120、180分間暗順応させ、眼球を遮光し た状態で灌流固定した。また、それぞれの群(時間) の暗順応開始5分前および暗順応終了5分後に、明順 応を継続させたラットを明順応下で灌流固定した。

上記のすべての実験条件下で,神経節細胞層で強く, 内顆粒層で中等度に a 2,6-ST の mRNA 発現が検出 された.しかし,視細胞内節部における a 2,6-ST の mRNA 発現の強さは,明順応と暗順応の時間に依存 して変化した.すなわち,明順応5分後から3時間後, あるいは27時間後(明順応継続の分)まで,すべての 明順応条件下で, 視細胞内節部に基底部から先端部ま でびまん性に  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の強い発現が観察 された (図 9 a). 一方, ラットを暗順応させた場合, 時間の経過とともに 1 時間まで視細胞内節部における  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の発現の強さが減弱し, 内節基底 部に限局した発現が観察された. そして, それ以上暗 順応させても  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の発現の強さと分 布は変化せず, 27 時間まで(明順応順応開始前を含む) ほぼ同定度の軽度の発現が内節基底部に観察され続け た (図 9 b).

なお,視細胞内節部の mRNA の発現の強さについ ては,組織写真をカラースキャナ(Epson GT-8000) で取り込み,Macintoshの画像解析ソフト(Image, NIH)を用いて,各々の光の条件について 20 か所ずつ 濃度測定し,平均値と標準偏差値とを算出した(図 10).明順応網膜と暗順応 60 分,暗順応 120 分の網膜 との間にそれぞれ有意の差をみたが,暗順応 120 分と 180 分の間,および明順応 5 分,30 分,60 分の間では, 有意の差をみなかった.すなわち,上記の観察結果を 統計的にも裏付けることができた.また,このような



図 9 明順応,暗順応ラット網膜の α 2,6-sialyltransferase mRNA 発現分布. 明順応 (a),暗順応 (b) 網膜ともに,外顆粒層,内顆粒層,神経筋細胞層にmRNA の発現像が観察される.視細胞内節に関しては,明順応 (a) 網膜では内節部全体にび まん性の,暗順応(b)網膜では内節基底部に限局したmRNA の発現像が観察される. IS:視細胞内節. パーは 20 μm

1382



図 10 ラット視細胞内節部 α 2,6-sialyltransferase mRNA 発現の, 明順応, 暗順応の時間経過に伴う変化. 縦軸は, 画像解析によって得られた, それぞれの光 条件下での視細胞内節部mRNA発現の濃度 (units)を表している. 暗順応の時間の経過ととも に, 緩徐にmRNA 発現が減少する. 明順応によっ て, 急激にmRNA 発現が増加する. t検定により, 明順応網膜と暗順応 60 分, 120 分の網膜との間に, mRNA 発現の程度に有意の差が検出される (p< 0.001).

視細胞内節部の  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の発現の強さは, 灌流固定した時刻には依存しないことも確認された.

本研究結果から, 視細胞内節部の α 2,6-ST mRNA の発現がサーガディアンリズムに無関係に, 局所的効 果としての光照射によって急速に増加し, 光遮断に よって緩徐に減少することが明らかになった. この実 験結果と IPM 光応答の発現との関係について考察し てみたい.

まず、第1相目の IPM 分布の変化は、光に応答して 増加した α 2.6-ST によって糖鎖末端にシアル酸が付 加され、いわゆる epitope の変化が起こるために視細 胞外節中間部のIPMの免疫組織化学的染色性が弱く なる、という現象を表している可能性がある、この考 え方が正しいとすれば, 視細胞外節中間部においてシ アル酸を認識するレクチンである WGA 染色像は増 強し、かつ、組織切片を neuraminidase 処理してから Gal & 1.4 GlcNAc (N-グリコシド結合型糖鎖のシアル 酸を除けば最末端に位置する)を認識するレクチンで ある RCA-140)で染色すると、この部位の IPM は暗順 応網膜と同様にびまん性に染色されるはずである.し かしながら、先に報告<sup>38)39)</sup>したように、WGA 染色像、 および組織切片を neuraminidase 処理した後の RCA-1 染色像ともに、明順応網膜の杆体外節中間部の IPM の染色は弱いことから、この考え方は否定できる

であろう.したがって、第1相目の IPM 光応答では、 IPM の N-グリコシド結合型複合糖質成分そのものの 局在部位が変化するものと考えられる。 この局在部位 変化の発現の機序については、シアル酸の陰性荷電に 注目して次の項(V)で詳細に考察する. 成熟ラットの 杆体視細胞においては、生後早期(16日以前)と異な り. いったん N-グリコシド結合型複合糖質の糖鎖が Gal & 1.4 GlcNAc まで形成された場合、そのまま一挙 に a 2,6-ST によってシアル酸が付加されるであろう. すなわち, α 2,6-ST mRNA の発現の増加は. N-グリ コシド結合型複合糖質産生の増加をそのまま反映して いるといえる.実際に、光照射で増加する N-グリコシ ド結合型の複合糖質としてレクチン組織化学的に同定 されるのは内節部の IPM であり、この第2相目の光 応答を、光に応答した a 2.6-ST の mRNA の発現の増 加によって説明できるであろう、通常の組織化学的手 法では,既に産生されていた成分と新しく産生された 成分とを区別することはできないので, in situ hybridization 組織化学の手法が有用な武器となり得たとい える.

ところで、実験的、あるいは遺伝性視細胞変性網膜 を用いた研究結果から、IPM の光応答の発現には正常 視細胞外節の存在が必要であることが判明してい る<sup>62)</sup>.したがって、順序としては、まず外節に存在する ロドブシンで光が受容され、それに引き続いて IPM の分布の変化が迅速に起こり〔次の項(V)で詳細に考 察〕、さらに IPM の N-グリコシド結合型複合糖質成分 が新しく産生され、次第に内節部に蓄積するものと考 えられる.

オプシン mRNA の発現が光照射で増加するとの報告<sup>51)</sup>がある.オプシンは、N 末端側に 2 か所、N-グリ コシド結合型糖鎖の結合部位を有している<sup>63)</sup>ことか ら、N-グリコシド結合型糖蛋白である.しかし、その 糖鎖には、GlcNAc、マンノース<sup>64)65)</sup>とガラクトー ス<sup>66)67)</sup>は含まれるが、シアル酸は含まれない<sup>68)</sup>.した がって、本研究で同定された  $\alpha$  2,6-ST は、オプシンの 糖鎖形成には関与していないものと考えられる.

一方, 成熟マウスを2週間暗順応させると, IRBP mRNA 発現が半分に減少することを, northern blot を用いて検出した報告がある<sup>69)</sup>. IRBP は, RCA-1 で 認識される N-グリコシド結合型糖鎖を有し, かつ, そ の末端にシアル酸が存在する<sup>42)</sup>ことから, 本研究で同 定された  $\alpha$  2,6-ST mRNA 発現の明・暗順応における 変化は, 一部 IRBP mRNA 発現の変化を反映してい る可能性が高い、暗順応網膜では、暗順応の時間の経 過とともに、α 2.6-ST の mRNA の発現は減少した が、完全に抑制されたわけではなく、内節基底部に発 現の継続している像が観察された.長期間(~1か月) 暗順応させた網膜でも同様の α 2.6-ST の mRNA の 発現が持続して観察されたことから、α2.6-STの mRNAの半減期が長く、内節基底部にとどまったと いうわけではなさそうである、peripherin/rdsの mRNA の発現は、明・暗に無関係に、あるいは日内変 動もなく、強く持続的に発現していた、peripherin/rds は、糖鎖がアスパラギン結合するためのアミノ酸配列 を持っていることから、N-グリコシド結合型の糖蛋白 であるとみなされている48). 暗順応下でも弱いながら、 内節基底部で mRNA が継続発現し、合成され続けて いる a 2.6-ST は, peripherin/rds などの暗順応下でも そのmRNAが発現し続ける N-グリコシド結合型の 糖蛋白の糖鎖形成に関与している可能性が高い.また. IRBP の mRNA の発現も暗順応下で完全に抑制され るだけではなく、これらの糖鎖形成にも関与している であろう.

ところで、 $\alpha$  2,6-ST の mRNA が、明順応網膜では 内節全体に、暗順応網膜では内節基底部に限局して観 察されるのはなぜであろうか.通常、視細胞内節基底 部にリボソームを含む粗面小胞体が局在し、それ以外 にも内節先端部まで遊離のリボソームが分布する。暗 順応網膜の視細胞で必要とされる  $\alpha$  2,6-ST は、粗面小 胞体に結合したリボソームにおける蛋白合成だけで十 分足りるために、その mRNA の発現分布は内節基底 部に限局しているのかも知れない。明順応下では、 IRBP などが多量に必要となり、そのシアリル化に多 量の  $\alpha$  2,6-ST を必要とし、内節全体に分布する遊離の リボソームまで動員されるために、 $\alpha$  2,6-ST mRNA は内節全体にわたってびまん性に検出されるのかも知

これに関連して、電子顕微的に明順応と暗順応網膜 を比較すると、内節先端部に分布する遊離のリボソー ムの分布様式が異なっていることが、最近、共同研究 者の鮫島、大久保らによって確認された(第97回日本 眼科学会総会一般講演で報告). 暗順応網膜では、リボ ソームがリング状に集簇し、いわゆるボリソームの形 態をとるのに対し、明順応網膜ではびまん性に散在し て分布する. 従来、ポリソームの形態をとるリボソー ムが蛋白を合成しているとする説と、逆の説とがあり、 未だ明確な結論は得られていないが、上記の網膜 in



図11 視細胞内節リボソームにおける蛋白合成の模 式図

視細胞内節基底部の粗面小胞体では,持続性に蛋白 が合成される.暗順応網膜の視細胞内節の遊離のリ ボソームは,集簇型分布を示し,蛋白合成は不活発 である.明順応網膜の遊離のリボソームは,分散型 分布を示し,蛋白合成が活発である.

situ hybridization 組織化学の結果と,電子顕微的所見 とを対比した限りにおいては,分散型のリボソームが 蛋白合成している活性型ではないかと考えられる.図 11 に,これらの研究結果に基づいた視細胞内節リボ ソームにおける蛋白合成に関する模式図を示した.す なわち,視細胞では,通常,内節基底部の粗面小胞体 に結合したリボソームで蛋白が持続的に合成されてい るが,光照射など特別の場合には,遊離のリボソーム も活性化されて,蛋白合成が促進されるという仮説を 提唱したい.

## V 光受容体間基質(IPM) 光応答の発現機構

N-グリコシド結合型複合糖質糖鎖末端のシアル酸 が, IPM 光応答の発現に重要な役割を果たしている可 能性について前項で述べた.ここでは、シアル酸の有 する陰性荷電に注目して、さらに電気生理学的側面を 含めて考察したい.なお、本作業仮説の原型について は先に報告<sup>70</sup>した.

IPM の光応答は, 杆体視細胞外節の光受容に続発し て, 杆体周囲のシアル酸を含有する N-グリコシド結合 型複合糖質成分に起こる.光受容によって, 杆体外節 は過分極, すなわち細胞外の IPM に比べ相対的に陰 性荷電が増大した状態になる(実際にはカチオン流入 の減少としてとらえられる).単純に考えれば, この増

1383

《圣堂子》题》上 人名德尔姓氏

大した陰性荷電によって、杆体周囲のシアル酸を含有 する IPM の陰性荷電成分が排斥される形で、第1相 目の光応答は起こるのではないかと考えたい、細胞表 面の複合糖質のシアル酸は陰性荷電をもつために、カ チオンをカチオンチャンネル近くに保持する機能を有 している、第1相目の光応答で、仮に1つの杆体外節 周囲の IPM のシアル酸含有複合糖質の分布が変化し た場合、それに伴って IPM 中のカチオンも引っ張ら れて,光量子を受容した杆体に隣接する杆体外節形質 膜のカチオンチャネル周囲のカチオンが減少する可能 性がある. cGMPの酵素カスケード系を介したカチオ ンチャネルの閉鎖が起こらなくとも、細胞外のカチオ ンの減少に続発する形で外節内へのカチオン流入が減 少すれば、それが電気的には外節の過分極の状態を引 き起こしたのと同じ状態になるのかも知れない. この ような形で、次々とシアル酸分子の動きが減衰するま で、あるいはシアル酸を含有しない錐体視細胞周囲の IPM にぶつかるまで,杆体外節の過分極の情報が伝達 されるのではないかと考えたい.

ところで、仮に1個の光量子が1つの杆体外節のロ ドプシンで受容され、信号が cGMP の酵素カスケード 系を経て増幅され、その杆体外節が過分極し、軸索終 末部からのトランスミッターの放出が減少、停止した とする.通常,複数本の杆体視細胞の軸索が,1つの 双極細胞にシナプスを形成しているので、1本の杆体 視細胞軸索からの定常的なトランスミッターの放出が 減少,停止したとしても,その他の杆体視細胞の軸索 からトランスミッターが多量に放出され続ける限りに おいては、シナプス後膜(双極細胞)の変化は起こら ないのではないかと考えられる.確かに cGMP の酵素 カスケードの増幅機構で,杆体視細胞単独の光受容の 高感度は説明される.しかし、次の双極細胞に光受容 の情報が伝達されない限り, 視覚生理学的には光を受 容したことにならないのではなかろうか.もし、複数 本の杆体視細胞の軸索からのトランスミッターの放出 の減少、消失が同時に起これば、次のニューロンの双 極細胞に光受容の情報が伝達されるであろう、複数の 杆体視細胞の外節部分も軸索部分と同様に IPM を介 して機能的につながって、1つのユニットを形成して いる可能性がある. Copenhagen ら<sup>71)</sup>は, snapping turtle を実験動物として用いて、1個の杆体視細胞の 過分極の変化が隣接する杆体視細胞へ直接伝達される ことを、電気生理学的実験から明らかにしている.彼 らは, snapping turtle で形態学的に観察される杆体視 細胞の teleodendria によって情報が伝達されるもの と考えているが, IPM を介している可能性もあり, ラットでもこのような電気生理学的現象が起こってい る可能性があるであろう. IPM を介した隣接杆体視細 胞間の光受容の情報の伝達が, 複数の杆体視細胞と双 極細胞を含めた系で機能していると仮定するならば, この IPM 異常, とくに陰性荷電を有するシアル酸の 異常が, 視細胞の形態変化やロドブシンの異常などを 伴わない暗順応障害の発現に関与している可能性があ る.

一般的に、分子が"生きている状態"と"死んでい る状態"の違いは、分子間に協調が起きるか起きない かの違いであるとされている。例え本作業仮説が誤り であったとしても, 少なくとも外節形質膜のカチオン チャンネルが、その周囲のイオン環境の変化を受けな いはずはないであろう. 網膜下腔内の pH その他の, 光 によって引き起こされる変化を測定、比較した研究報 告もいくつかみられる72)73). 今後とも個々の視細胞外 節だけでなく、周囲の IPM を含め複数の視細胞,ある いは色素上皮細胞間の相互作用を考慮に入れた研究を 進めるべきである。ただし、網膜下腔内の物質測定を 行う場合,著者らの光に応答した IPM の分布の変化 まで考慮に入れると、単一の網膜下腔として扱うので はなく、いくつかの異なった部位(外節先端部、内節 基底部:錐体周囲~杆体周囲)について測定,比較す る必要性があることを強調しておきたい。 最後に,間接的にではあるが,シアル酸の電気生理 学的な重要性を示唆する実験結果を紹介して,この項 は終わりにしたい. 糖タンパクである fetuin(シアル酸 を含有)と asialofetuin (シアル酸を含有しない)の同 ーモル濃度の蒸留水溶解液の電気抵抗を, マルチテス ター(AP-50,三和電気)を用いて測定,比較し、t検 定を行ったところ、前者(13.7±0.5 KΩ)の方が後者 (24.5±1.1 KΩ)に比べ有意に低かった (p<0.001). ウシ網膜から IPM を蒸留水によって抽出し、無処理 のもの, neuraminidase 処理したもの, neuraminidase 処理してかつ透析によってシアル酸を除去したものに ついて電気抵抗を測定,比較し,t検定を行った.Neuraminidase 処理してかつ透析によってシアル酸を除去 したもの(196.7±15.1 KΩ)は、無処理のもの(29.5± 2.1 KΩ), および neuraminidase 処理だけのもの (29.3±0.9 KΩ)に比べ電気抵抗が有意に高かった (p<0.001). すなわち、シアル酸を含有する方が、含 有しない場合に比べ電気抵抗はすべての場合について

平成5年12月10日

低く、シアル酸が存在する方が電気が流れやすいとい える、サルの網膜を剝離し、視細胞側の電気抵抗を網 膜の異なる部位について測定,比較し,t検定したとこ ろ、 黄斑部 (64.8±3.6 KΩ) の方が赤道部 (41.6±4.8 KΩ)よりも電気抵抗が有意に高かった(p<0.001). すなわち、シアル酸を含有しない錐体周囲 IPM の多 い黄斑部の方がシアル酸を含有する杆体周囲 IPM の 多い赤道部より電気抵抗が高いといえる、したがって、 杆体周囲 IPM の方が、錐体周囲 IPM に比べ電気が流 れやすく, 1個の杆体の電気生理学的な変化は, 隣接 する杆体に電気生理学的な影響を及ぼす可能性が高い といえるかも知れない. それに対し, 錐体視細胞はそ の周囲の IPM によって電気的に絶縁されているのか も知れない、今後、さらに微小電極を用いた実験など を進める必要性があるが、この単純な実験結果から、 IPM のシアル酸が電気生理学的にも重要な役割を果 たしているのではないかという問題を提起したい。

## VI 視細胞変性網膜複合糖質の 分子細胞生物学的研究

1. はじめに

著者らは, 複合糖質異常と視細胞変性との関係につ いても研究を進めてきた. すなわち, 共同研究者の内 匠は、ラット網膜に N-グリコシド結合型糖鎖に結合す るレクチン(WGA あるいは RCA-1)を作用させた場 合, 視細胞変性が発生する74)のに対し, O-グリコシド 結合型糖鎖に結合する PNA では発生しない75)ことを 明らかにした.また,N-グリコシド結合型糖鎖形成の 抑制作用を有する tunicamycin を網膜に作用させる と,新生される視細胞外節根部が空胞化するという報 告76)もある、これらの研究結果から、O-グリコシド結 合型より N-グリコシド結合型複合糖質成分の方が,視 細胞の形態を維持するために、より重要な役割を果た していることが推定される.一方,著者らは、 sialvltransferase (ST) 活性修飾剤, あるいは neuraminidase を網膜に作用させ、複合糖質糖鎖末端のシ アル酸部分を修飾することによっても、視細胞の形態 異常が起こることを観察している55)77).したがって, N-グリコシド結合型複合糖質の異常,とくにその糖鎖 末端のシアル酸の異常が,原発性あるいは続発性に視 細胞の変性を促進している可能性がある. そこで, N-グリコシド結合型糖鎖末端にシアル酸を付加する α2. 6-ST の遺伝子の, 種々の型の視細胞変性網膜における 発現異常の有無について, in situ hybridization 組織 化学的に検索した.

一方, 視細胞外節円盤膜の構造維持に重要な, N-グ リコシド結合型糖蛋白である peripherin/rds の遺伝 子異常が, retinal degeneration slow マウス<sup>78)~80)</sup>や, 一部の常染色体優性遺伝の網膜色素変性症患者<sup>81)82)</sup>の 視細胞変性の発現に関与していると報告されている. そこで, 種々の型の視細胞変性網膜における peripherin/rds 蛋白の mRNA の発現についても, in situ hybridization 組織化学的に検索し,  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の発現に関する結果と比較した. また, peripherin/rds は視細胞だけで発現することが, 正常網膜 の in situ hybridization 組織化学的検索によって判明 したので, 一部の変性網膜については, 全 RNA を抽出 し, northern hybridization 法を用いた解析も実施し た.

2. 連続光照射によって引き起こされた視細胞変性 網膜の分子細胞生物学的解析<sup>83)</sup>

ケージ床面から 60 cm の高さに保持した 2 本の 37 W 白色螢光灯 (ケージ部照度は 1,100~1,500 1 x) 照 明下に, Wistar ラット(8 週齡)を 3 日間~2か月間 飼育した. 螢光灯光連続照射 3 日間,5 日間,1週間, 2 週間,1か月間,2か月間の時点でラットをそれぞ れ灌流固定し,網膜の形態について調べるとともに, in situ hybridization 組織化学的に,網膜の $\alpha$  2,6-ST および peripherin/rdsの mRNA の発現状況について 検索した.

3日間光連続照射した網膜では、下半球の視細胞外 節にはほとんど形態変化をみなかったが、上半球の外 節は軽度ながら短縮していた. α 2,6-ST および peripherin/rdsのmRNAの発現は、両者とも上半球の周 辺部から後極部網膜では内節部にほとんど検出され ず,外境界膜付近の外顆粒層には散在性に発現してい た、一方、下半球の周辺部から赤道部の網膜では、外 境界膜付近の外顆粒層に散在性に,内節基底部にびま ん性に a 2.6-ST および peripherin/rdsの mRNAの 発現が検出された.3日間光連続照射した網膜では、 視細胞外節, 内節は高度に変性・短縮し, 外顆粒層と 外網状層も薄くなっていた. 網膜のいずれの部位にお いても、 a 2,6-ST および peripherin/rdsの mRNAの 発現は検出されなかった. それ以降, 光照射期間が長 くなるに従い, 視細胞外節, 内節は消失し, 上記の mRNAの発現が再び検出されることはなかった。一 方,光連続照射に伴う peripherin/rds mRNA 発現の 減少については, northern hybridization 法によって

も確認された.本研究の要旨については,共同研究者の柳田が第97回日本眼科学会総会一般講演で報告した.

3. 糖鎖修飾性薬物によって引き起こされた視細胞 変性網膜の分子細胞生物学的解析

1) Neuraminidase を硝子体内に注入した網膜

塩酸ケタミン (20mg/kg) 筋注, ペントバルビター ルナトリウム(20mg/kg)腹腔内注射麻酔下に, neuraminidase (Clostridium perfringes V型; ナカライ) を 2 U/ml 濃度に PBS に溶解した液を 40  $\mu$ l ずつ, 26-gauge の注射針を用いて Wistar ラット硝子体内に 注入した. 注入後 6, 12, 24 時間後に, ラットをそれ ぞれ灌流固定し, 網膜の形態変化と,  $\alpha$  2,6-ST および peripherin/rds の mRNA の発現状況とについて検索 した.

予備実験的に注入後6時間では、視細胞層のレクチ ン染色性が IPM を含めて変化することから, neuraminidase が網膜下腔まで到達し, IPM および視細胞 表面に作用している6)と考えられるが、注入後6時間 ではまだ網膜視細胞の形態変化は起こっていなかっ た. しかしながら、  $\alpha$  2,6-ST および peripherin/rdsの mRNA の発現は、既に軽度減少している像が検出さ れた. 注入後12時間では, 視細胞外節が軽度短縮して いたが、その他はとくに網膜の形態変化は観察されな かった. 視細胞内節には形態変化はみられなかったが, α 2,6-ST および peripherin/rdsの mRNAの発現は ごく微弱にしか検出されなかった。注入後24時間で は、視細胞外節の短縮化がさらに著明となったが、依 然として網膜のその他の層の形態変化は観察されな かった. a 2,6-ST および peripherin/rdsの mRNA の発現は全く検出されなかった.本研究の要旨につい ては、共同研究者の中嶋が第97回日本眼科会総会一般 講演で報告した.

2) レクチンを硝子体内あるいは網膜下腔内に注入 した網膜

塩酸ケタミン (20 mg/kg) 筋注, ベントバルビター ルナトリウム(20 mg/kg)腹腔内注射麻酔下に, WGA あるいは PNA を 1 mg/ml 濃度に PBS に溶解した液 を 50  $\mu$ l ずつ, 30-gauge の 注射針 を 用いて Wistar ラット網膜下腔内に注入した. 注入後 6, 24, 72 時間 後に, ラットをそれぞれ灌流固定し, 網膜の形態変化 と,  $\alpha$  2,6-ST および peripherin/rds の mRNA の発現 状況とについて検索した. レクチンを網膜下腔内に注 入した場合, WGA は IPM を含む視細胞外節全体の表 面に結合するのに対し, PNA は錐体周囲の IPM にの み結合することを確認している<sup>20)</sup>.

WGA を作用させた場合,注入後 24 時間では,視細胞外節の長さが軽度短縮するとともに,内節部の  $\alpha$  2,6-ST および peripherin/rdsの mRNA の発現が 軽度減少している像が観察された.注入後 72 時間で は,外節は高度に短縮し,内節部の mRNA の発現はほ とんど検出されなくなった.

一方, PNA を作用させた場合, 注入後 72 時間まで 観察した限りにおいては, 視細胞の形態変化も内節部 の α 2,6-ST および peripherin/rds の mRNA の発現 減少像も検出されなかった.本研究の要旨については, 共同研究者の菅田が第 97 回日本眼科学会総会の一般 講演で報告した.

 遺伝性視細胞変性網膜の分子細胞生物学的解析 遺伝性に視細胞変性が起こる nervous (nr) マウ ス<sup>84)</sup>, および Purkinje cell degeneration (pcd) マウ ス<sup>84)</sup>を, 生後,経時的に灌流固定し, 網膜の形態変化と, α 2,6-ST および peripherin/rds の mRNA の発現状 況とについて in situ hybridization 組織化学的に検索 した.

nr マウス, pcd マウスともに、生後2か月では中等度に、4か月では高度に視細胞外節が短縮している像 $が観察された。<math>\alpha$ 2,6-ST および peripherin/rdsの mRNAの発現も、経時的に減少していく像が観察さ れたが、生後4か月目の時点では、まだこれらの mRNA が内節基底部に発現している像が検出され た.

5. 視細胞変性網膜複合糖質の分子細胞生物学的考 察

まず,視細胞変性と IPM の光応答との関係につい て考察したい.種々の遺伝性視細胞変性動物網膜や, 過度の光照射した網膜の視細胞変性の過程で,共通し て IPM の光応答は消失し,視細胞内節・外節周囲にび まん性に IPM のシアル酸含有 N-グリコシド結合型複 合糖質成分が分布することを先に報告した<sup>62)</sup>.外節が 変性に伴って異常になり,正常に光を受容できなく なったために, IPM の分布の変化が起こらなくなるの であろう. IPM 光応答の異常は,色素上皮細胞と視細 胞の間の物質交換の障害を引き起こし,視細胞の変性 過程を促進する可能性がある.

錐体視細胞周囲の IPM は、シアル酸含有が少ない ことから陰性荷電が少なく、視細胞外節の電位に束縛 されず、明・暗の光条件に無関係に自由に拡散が起こっ

ているのではないかと考えられる.一方,暗順応下で は、杆体外節は過分極していないので、陰性荷電の多 い杆体周囲 IPM も, 錐体周囲 IPM と同様に比較的自 由に拡散できるのかも知れない。光に応答した IPM 分布の変化は、光があたった直後に起こるビタミンA などの運搬に関与している可能性が高い. 光が照射さ れ続ける限りにおいては、陰性荷電の多い杆体周囲 IPM の動きは外節の陰性荷電によって制限され、IPM 成分の蓄積が持続し、視細胞と色素上皮細胞との間の 物質交換が阻害されて, 視細胞変性の進行が促進され る可能性がある、しかし、この場合でも、視細胞外節 円盤膜の新生が抑制されない限りにおいては、完全に 視細胞が変性に陥ることはないであろう. IPM 成分が 内節周囲に蓄積することによって, 膜の receptor を介 して、あるいは内節で産生された IPM 成分が網膜下 腔へ分泌されるのが阻害されて, 内節内部に蓄積する ことによって、種々の遺伝子発現が抑制されるのかも 知れない. 事実, 他の組織では, 細胞外基質の変化が 細胞内の遺伝子発現に影響を及ぼすことが報告されて いる85)~87)。また、本研究で網膜下腔に注入した WGA は、杆体周囲の N-グリコシド型の IPM 複合糖質をび まん性に凝集させ、その動きを抑制するように働いた のではないかと考えられる. PNAは, 錐体周囲の O-グ リコシド型の IPM 複合糖質を凝集させたはずである が,もともとこの型の複合糖質は視細胞と色素上皮細 胞との間の接着に関与していると考えられ、その力が 強まっただけで、N-グリコシド型の複合糖質の動きは 阻害されなかったために、PNA の作用は視細胞を変 性させる方向に働かなかったのかも知れない.

ところで、N-グリコシド結合型糖蛋白である peripherin/rds の糖鎖部分が、視細胞外節円盤膜の形態保 持に重要な役割を果たしているのではないかと考えら れている<sup>53)</sup>.また、tunicamycin を正常網膜に作用させ て、N-グリコシド結合型糖鎖の形成を阻害すると外節 の変性が起きる<sup>76)</sup>ことから、N-グリコシド結合型糖鎖 の形成に関与する種々のglycosyltransferase 遺伝子 の発現異常によって視細胞の変性が起こる可能性があ る.しかし、今回使用した変性網膜では、 $\alpha$  2,6-ST mRNA 発現の消失が peripherin/rds の mRNA 発現 の消失に先行している像を明確にとらえることはでき なかった. $\alpha$  2,6-ST mRNA の発現が原発性に抑制さ れるというよりは、むしろ peripherin/rds や IRBP な ど種々の視細胞特異的な N-グリコシド結合型複合糖 質のタンパク部分の mRNA 発現が減少し、次に core の 糖 鎖 形 成 に 関 与 する glycosyltransferase 群 の mRNA 発現が減少し、それに続発する形で最終的に  $\alpha$  2,6-STmRNA の発現が減少するのかも知れない. これらの遺伝子発現の減少は、時間的にはほぼ同時に 起こっているのかも知れない.

一方,遺伝子発現の減少の速さは,視細胞変性の型 によって異なっていた. すなわち, 持続性螢光灯光照 射や neuraminidase 注入によって引き起こされる視 細胞変性などのように、急激に視細胞外節が消失する 場合には、それに先行して既に  $\alpha$  2.6-ST と peripherin/rdsのmRNA がほとんど消失している像が観察 された.外節新生にあずかる種々の遺伝子の発現が完 全に阻害されたために,正常な円盤膜が形成・補給さ れずに、外節はそのまま早急に消失してしまったので あろう.一方、遺伝性視細胞変性マウス網膜を観察し た結果,緩徐に視細胞外節が変性・消失する過程にお いては、 a 2.6-ST, peripherin/rds mRNA の発現は, 漸減してはいくものの,外節変性の末期に至るまで軽 度ではあるが、内節基底部に観察された、これらのこ とから、貪食、破壊、その他によって消失する円盤膜 と、新しく内節から構成タンパクの供給を受け新生さ れる外節根部の円盤膜との量の差をもって,外節の全 長は短縮していくのではないかと推定される.共同研 究者の鮫島は neuraminidase を作用させた網膜を電 子顕微鏡的に検索して, 色素上皮細胞内にとりこまれ た外節円盤膜の数が増加しているのを観察している (第97回日本眼科学会総会一般講演で報告). Neuraminidase 注入によって急速に視細胞外節が短縮化す るのは、内節の機能が抑制されて外節が新生しないだ けでなく, 色素上皮細胞による外節貪食の増加が加 わっているためではないかと推定される.

内節の遺伝子発現の抑制に、先に述べたように本研 究報告の主題である IPM 光応答の異常が関与してい る可能性もある.この場合、遺伝子の promoter 部、あ るいは enhancer 部や suppressor 部を媒介している 可能性がある.視細胞で発現している種々の遺伝子は、 肝臓の場合<sup>60)</sup>と同様にそれぞれ共通の promoter 部を 有しているのかも知れない.内節に蓄積した IPM 成 分、あるいは外節変性に伴って変化する種々の因子が、 たとえば heat shock、重金属、ステロイドなどの効果 などと同様に、promoter 部に影響を及ぼしているの かも知れない.

一方,遺伝子発現が抑制されるのは, promoter 部を 媒介していない可能性もある. 視細胞の変性過程にお いて、まず最初に、明順応の状態にありながら、視細胞内節の遊離のリボソームが、いわゆる不活性型と考えられる集簇型の形態となっている像を、共同研究者の大久保は観察している(第97回日本眼科学会総会一般講演で報告). これは、視細胞変性進行の過程でリボ ソームそのものが障害を受け、非特異的に内節で発現 する mRNA がすべて減少している可能性を示唆す る. 遺伝性視細胞変性マウスなどでは、内節基底部に 局在する粗面小胞体は、変性後期まで障害されにくく、 変性視細胞では、内節の基底部だけには peripherin/ rds mRNA や  $\alpha$  2,6-ST mRNA は発現し続けるのか も知れない.

いずれの機序が働いているにしろ、もし内節の mRNA の発現の減少を抑制できるならば、ある程度 の長さの外節を維持できる可能性がある. 最近, ロド プシンやペリフェリンの遺伝子異常が常染色体優性遺 伝の網膜色素変性症の一部の患者の発現に関与してい る可能性が示唆されている82)83)88). この場合でもいっ たんは外節は形成されるわけであるから、何らかの機 序で内節の機能が抑制されて正常な円盤膜の新生機能 が障害されない限り, 視細胞変性は進行しないはずで ある. 網膜色素変性症の原因遺伝子の同定に関する研 究は, 種々の候補遺伝子について現在世界中で進めら れており,いずれ個々の症例に応じた原因療法(遺伝 子治療)が実施可能となるかも知れない、しかし、多 くの網膜色素変性症に共通した,対症療法としての内 節機能維持のための処置も価値があると考える、実験 的には硝子体内,あるいは網膜下腔内への細胞増殖因 子投与によって, RCS ラットや, 持続螢光灯照射した ラットの視細胞の変性速度が遅延する89)90). 膜レセプ ターを介して, 視細胞の遺伝子が抑制されないように 制御されるのかも知れない、イデベノン(CoQu同族 体)投与によって網膜色素変性症患者の視機能障害の 進行が抑制されたとの報告もある\*1). ミトコンドリア の呼吸促進,あるいは過酸化脂質の生成の抑制が,残 存する内節機能の維持に役立っているのかも知れな い. 一方, 臨床的に広く用いられているロドプシン吸 収光波長をカットする調光レンズの使用も有用であ る<sup>92)93)</sup>. IPM 光応答との関係で考察すると、ロドプシ ンで吸収される光波長がカットされると、明順応下で の IPM の内節周囲への蓄積が抑制され、内節機能の 抑制の程度が軽くてすむのではないかと期待される. 今後,よりいっそうの研究が期待される.

#### VII 網膜複合糖質研究の現状と展望

O-グリコシド結合型(ムチン型) 複合糖質は、網膜 では視細胞と色素上皮細胞との間の接着に関与してい ると考えられる、Neuraminidase を網膜に作用させる と、杆体と色素上皮との接着が切断される6)94)ことか ら、とくにシアル酸が重要である。今回検索した N-グ リコシド結合型複合糖質と同様に, 分子細胞生物学的 研究を進める必要がある。O-グリコシド結合型糖鎖末 端にシアル酸を付加する α 2.3-sialvltransferase の cDNAも、Paulson 博士の研究グループによってク ローニングされ、その塩基配列が最近報告された95).著 者らは現在、その cDNA を α 2.6-ST と同様に PCR によって分離、cRNA プローブを合成し、綱膜視細胞 における発現に関する検索を進めている.一方, neuraminidase を作用させると、網膜色素上皮細胞による外 節の貪食が増加する、色素上皮細胞と視細胞の相互作 用において、シアル酸は、光受容体間基質の光応答(物 質輸送を含む),接着,貪食のすべてに重要な役割を果 たしているといえる.

このような生理学的に重要なシアル酸に異常が起こ れば,網膜視細胞の異常が起こってもおかしくないで あろうという視点から,シアル酸と視細胞変性との関 係について検索したわけであるが、今回使用した動物 の変性網膜では、視細胞の変性の過程でα2.6-STの遺 伝子発現が減少するが、それが peripherin/rds 蛋白遺 伝子発現の減少に先行している像を明確にとらえるこ とはできなかった.しかし、少なくとも、種々の異なっ た型の視細胞変性が進行する過程で、共通してこれら の N-グリコシド結合型複合糖質の形成に関与する遺 伝子の発現が減少し, その速さに比例して視細胞外節 の短縮化が進行することが明らかになった、 貪食、破 壊,その他によって消失する円盤膜と,新しく内節か ら構成蛋白の供給を受けて新生される外節根部の円盤 膜との量の差をもって、外節は短縮していくものと推 定される.

視細胞変性の成因の1つとして,原発性のシアル酸 異常が存在する可能性の有無についても検討する必要 がある.そのためには,遺伝子操作によってシアル酸 の異常を動物に引き起こし,視細胞の形態変化の有無 について調べるとよいであろう.具体的には,現在, 優性遺伝病の実験モデルの作製には,トランスジェネ シス法が,劣性遺伝病の実験モデルの作製には,遺伝 子の targeting 法が用いられている<sup>96)</sup>.これらは,遺伝 子治療にも使用しうる実験技術として注目されている.

共同研究者の池松は、最近、 a 1,3-galactosyltransferase (*a*1,3-GT) 遺伝子を強制的に発現させ たトランスジェニックマウスを作製することに成功し た. a 1,3-GT は a 2,6-ST と 競合し、シアル酸 a 2,6 Gal β1, 4 GlcNAc 糖鎖の生成を阻害し, 代わりに Gala 1,3 Gal β 1,4 GlcNAc 糖鎖の生成を促進する<sup>97)</sup>. すなわち, N-グリコシド結合型糖鎖末端に, シアル酸 の代わりにガラクトースを付加する. α 1.3-GT は正常 の成熟網膜では発現しないが、本トランスジェニック マウスの網膜では、α1,3-ガラクトースを特異的に認 識する Griffonia simplicifolia isolectin-B4が視細胞 外節部に強く結合したことから、視細胞において α1, 3-GT 遺伝子が発現していることが確認された.しか し、シアル酸と GlcNAc を認識する WGA でも依然と して視細胞外節部が強く染色されたことから、α2.6-ST と a1,3-GT とを競合させるだけでは、糖鎖末端の シアル酸を少し減少させることはできても、消失させ ることはできないものと考えられる。また、8週齢の α 1.3-GT 遺伝子が発現したトランスジェニックマウ ス網膜の組織像について検索したところ, 視細胞の形 態にとくに異常は認めなかった。しかし、シアル酸の 減少によって視細胞の寿命が短くなる可能性はあり、 高月齢のマウスについても検索する必要がある.

劣性遺伝形式の視細胞変性の原因の一つに、シアル 酸転移酵素遺伝子異常がなり得るかどうか明確にする ためには、 $\alpha$  2,6-ST 遺伝子そのものを targeting 法に よって欠失させ、それに伴う視細胞形態変化について 調べる必要がある.現在、共同研究者の柳田によって、 glycosyltransferase 遺伝子 targeting の研究が進行中 である.遺伝子 targeting 法を用いた研究は、種々の劣 性遺伝性疾患の原因解明に、今後、大きな威力を発揮 するであろう.

一方,共同研究者の鵜木が,網膜色素変性症患者リ ンパ球の種々のglycosyltransferase活性について測 定し,sialyltransferase活性が低値を示す症例が存在 することを先に報告した<sup>98)</sup>.今後,これらの患者につい ては,酵素遺伝子の塩基配列まで調べる必要があるで あろう.シアル酸異常と視細胞変性との関係に関する 最終的な結論を得るには,これらの研究結果を待たな ければならない.

#### VIII 総 括

レクチン組織化学的手法と,本研究で報告した glycosyltransferase mRNA O in situ hybridization 組織化学的解析を組み合わせることによって、 複合糖 質糖鎖の動態を動的にとらえることが可能となった. すなわち, N-グリコシド結合型糖鎖末端にシアル酸を 付加する酵素である, a 2,6-sialyltransferase (a 2, 6-ST)の遺伝子の視細胞における発現の変化につい て, 生後の, あるいは明・暗順応の時間を軸にして動 的に検索することによって, 杆体周囲光受容体間基質 (IPM)のN-グリコシド結合型複合糖質成分の光応答 発現に, 糖鎖末端のシアル酸が重要な役割を果たして いる可能性が高いことを示すことができた.一方,シ アル酸の有する電気生理学的な意義について指摘する とともに、IPM の光応答発現機序に関する著者らの仮 説を提唱した. さらに, in situ hybridization 組織化 学的検索に電子顕微鏡的検索を組み合わせ、それぞれ の結果を対照させることによって、mRNA の発現す る活性型リボソームは、ポリソームの形態ではなく、 散在性の分布形態をとることを明らかにした.また, 色素上皮細胞と視細胞の相互作用において、シアル酸 は、光受容体間基質の光応答(物質輸送)だけでなく、 接着, 貪食の機能の発現にも重要な役割を果たしてい ることを指摘した. このような重要なシアル酸に異常 が起これば、網膜視細胞の形態変化が起こってもおか しくないであろうという視点から、シアル酸と視細胞 変性との関係について検索した。今回使用した動物の 変性網膜では、視細胞の変性の過程でα2.6-STの遺伝 子発現が減少するが、それが peripherin/rds 蛋白遺伝 子発現の減少に先行している像を in situ hybridization 組織化学的には明確にとらえることはできな かった.しかし、少なくとも、種々の異なった型の視 細胞変性が進行する過程で,共通してこれらの N-グリ コシド結合型複合糖質の形成に関与する遺伝子の発現 が減少し、その速さに比例して視細胞外節の短縮化が 進行することを明らかにし得た. 貪食,破壊,その他 によって消失する円盤膜と,新しく内節から構成蛋白 の供給を受け新生される外節根部の円盤膜との量の差 をもって、外節は短縮していくものと推定された. 最 後に、現在進行中の遺伝子操作による網膜変性症の実 験モデルの作製に関する研究について紹介した.

1390

稿を終えるに当たり,宿題報告の機会を与えていただき ました日本眼科学会評議員の諸先生方に深く感謝致しま す.眼科入局以来,終始御指導と励ましを賜りました大庭紀 雄教授,複合糖質研究の御指導を賜りました村松 喬教授, 光受容体間基質研究の御指導を賜りました Motthew M. LaVail 教授に,深甚なる感謝の意を表します.また,共同 研究者をはじめ鹿児島大学医学部眼科学教室および第二生 化学教室の諸先生方の御協力に対し,厚く御礼申し上げま す.

なお,本研究には文部省科学研究費補助金(一般研究 C 05671470),平成5年度日本医師会医学研究助成費の援助を 受けたことを,ここに付記して謝意を表します.

#### 献

文

- Sharon N, Lis H: Glycoproteins: Research booming on long-ignored, ubiquitous components. Chem Eng News 59: 21-44, 1981.
- Hakomori S: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. Ann Rev Biochem 50: 733-764, 1981.
- 3) 鈴木明身,谷口直之,古川 清,井上圭三編:複 合糖質,細胞認識から病態まで、蛋白質 核酸 酵素 37:1683-2134,1992.
- 4) 松尾義之:第3の分子生物学.糖鎖.日経サイエンス 259:18-55,1993.
- 5) O'Brien PJ: Rhodopsin as a glycoprotein: A possible role for the oligosaccharide in phagocytosis. Exp Eye Res 23: 127–137, 1976.
- と原文行,大庭紀雄, Yasumura D, LaVail MM: 光受容体間基質のレクチン組織化学的研究
   Neuraminidase 誘発網膜剝離部の検討.日眼会誌 95:332-335,1991.
- Mullen RJ, LaVail MM: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. Science 192: 799-801, 1976.
- 大沢利昭編:レクチンと細胞生物学.東京,講談 社サイエンティフィク,1-243,1985.
- Sharon N, Lis H (大沢利昭,小浪悠紀子訳):
  レクチン、東京,学会出版センター,1-164,1990.
- 10) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. Exp Eye Res 36: 113-123, 1983.
- 11) Uehara F, Muramatsu T, Sameshima M, Ogata S, Ohba N: Identification of peanut agglutinin receptors in the monkey retina. Exp Eye Res 37: 303-305, 1983.
- Kawano K, Uehara F, Sameshima M, Ohba N: Binding sites of peanut agglutinin in mammalian retina. Jpn J Ophthalmol 28: 205-214, 1984.

- 13) Uehara F, Muramatsu T, Sameshima M, Kawano K, Koide H, Ohba N: Effects of neuraminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. Jpn J Ophthalmol 29: 54-62, 1985.
- 14) Uehara F, Muramatsu T, Ozawa M, Koide H, Sameshima M, Ohba N: Purification of antibody against peanut agglutinin receptors of bovine interphotoreceptor matrix. Jpn J Ophthalmol 30: 56-62, 1986.
- 15) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N: Twodimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors in the bovine interphotoreceptor matrix. Exp Eye Res 43: 227-234, 1986.
- 16) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Affinity isolation of cone outer segment using a peanut agglutinin-nitrocellulose sheet. Exp Eye Res 43: 687-693, 1986.
- 17) Sameshima M, Uehara F, Ohba N: Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. Exp Eye Res 45: 845-863, 1987.
- 18) Unoki K, Uehara F, Sameshima M, Ohba N: Specific binding of peanut agglutinin to foveal and peripheral cone photoreceptors of monkey retina. Ophthalmic Res 20: 112–116, 1988.
- 19) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM: Lectin binding of the interphotoreceptor matrix during retinal development in normal and RCS rats. Curr Eye Res 9: 687-695, 1990.
- 20) Takumi K, Uehara F: In vivo lectin-binding of photoreceptors and interphotoreceptor matrix in rat. Jpn J Ophthalmol 35: 16-22, 1991.
- 21) Röhlich P: Photoreceptor membrane carbohydrates on the intradiscal surface of retinal rod disks. Nature 263: 789-791, 1976.
- 22) Hall MO, Nir I: The binding of concanavalin A to the rod outer segments and pigment epithelium of normal and RCS rats. Exp Eye Res 22: 469-476, 1976.
- 23) McLaughlin BJ, Wood JG: The localization of lectin binding sites on photoreceptor outer segments and pigment epithelium of dystrophic retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci 19:728-742, 1980.
- 24) Bridges CDB: Lectin receptors of rods and cones. Visualization by fluorescent label. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 8-16, 1981.
- 25) Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N: The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (Arachis

hypogaea). J Biol Chem 250: 8518-8523, 1975.

- 26) Blanks JC, Johnson LV: Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 546-557, 1984.
- 27) Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC: Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 129-135, 1986.
- 28) Nagata Y, Burger MM: Wheat germ agglutinin: Molecular characteristics and specificity for sugar binding. J Biol Chem 249: 3116-3122, 1974.
- 29) Hollyfield JG, Rayborn ME, Landers RA, Myers KM: Insoluble interphotoreceptor matrix domains surround rod photoreceptors in the human retina. Exp Eye Res 51: 107-110, 1990.
- 30) Kivela T, Tarkkanen A: A lectin cytochemical study of glycoconjugates in the human retina. Cell Tissue Res 249: 277-288, 1987.
- 31) Molday LL, Molday RS: Glycoproteins specific for the retinal rod outer segment plasma membrane. Biochim Biophys Acta 897: 335-340, 1987.
- 32) Cohen D, Nir I: Cytochemical characterization of sialoglycoconjugates on rat photoreceptor cell surface. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 640-645, 1987.
- 33) Polans AS, Burton MD: Sialoglycoconjugates of the frog rod outer segment plasma membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1523 -1532, 1988.
- 34) LaVail MM, Pinto LH, Yasumura D: The interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 21: 658-668, 1981.
- 35) Porrello K, LaVail MM: Histochemical demonstration of spatial heterogeneity in the interphotoreceptor matrix of the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1577-1586, 1986.
- 36) Porrello K, Yasumura D, LaVail MM: Immunocytochemical localization of chondroitin sulfates in the interphotoreceptor matrix of the normal and dystrophic rat retina. Curr Eye Res 5: 981-993, 1986.
- 37) Tawara A, Varner H, Hollyfield JG: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. I. Histochemical studies using cuprolinic blue. Exp Eye Res 46: 689-704, 1988.
- 38) Uehara F, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. Science 248: 1633-1636.

1990.

- 39) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM: Rodand cone-associated interphotoreceptor matrix in the rat retina: Differences in light-evoked distributional changes. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 285-292, 1991.
- 40) Olsness S: Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. Methods in Enzymology 50: 330-335, 1978.
- 41) Hageman GS, Johnson LV: Chondroitin 6sulfate glycosaminoglycan is a major constituent of primate cone photoreceptor matrix sheaths. Curr Eye Res 6: 639-646, 1987.
- 42) Fong S-L, Liou GI, Landers RA, Alvalez RA, Bridges CD: Purification and characterization of a retinol-binding glycoprotein synthesized and secreted by bovine neural retina. J Biol Chem 259: 6534-6542, 1984.
- 43) Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai P-H, Paulson JC: Primary structure of βgalactoside α2,6-sialyltransferase. J Biol Chem 262: 17735-17743, 1987.
- 44) Hofler H: Principles of in situ hybridization. In : Polak JM, et al (Eds) : In situ Hybridization. Principles and Practice. Oxford University Press, Oxford, 1-29, 1990.
- 45) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987.
- 46) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350–1354, 1985.
- 47) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467, 1977.
- 48) Connell GJ, Molday RS: Molecular cloning, primary structure, and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. Biochemistry 29: 4691-4698, 1990.
- 49) Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP, Lowe JB: A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group α(1,3/1,4) fucosyltransferase. Genes and Development 4: 1288–1303, 1990.
- 50) Uehara F, Ohba N, Nakashima Y, Yanagita T, Ozawa M, Muramatsu T: A fixative suitable for in situ hybridization histochemistry. J

日眼会誌 97巻 12号

Histochem Cytochem 41: 947-953, 1993.

- 51) Korenbrot JI, Fernald RD: Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. Nature 337: 454-457, 1989.
- 52) Porrello K, Bhat SP, Box D: Detection of interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) mRNA in human and cone-dominant squirrel retinas by in situ hybridization. J Histochem Cytochem 39: 171-178, 1991
- 53) Molday RS, Hicks D, Molday L: Peripherin. A rim specific membrane protein of rod outer segment discs. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 50 -61, 1987.
- 54) Uehara F, Ohba N, Nakashima Y, Yanagita T, Ozawa M, Muramatsu T: Developmental change of distribution of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialytransferase mRNA in rat retina. Exp Eye Res 56 : 89–93, 1993.
- 55) 上原文行, 大庭紀雄, Yasumura D, LaVail MM: Neuraminidase 起因性網膜変化. あたらしい眼科 7:1701-1704, 1990.
- 56) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM: Development of light-evoked changes of the interphotoreceptor matrix in normal and RCS rats with inherited retinal dystrophy. Exp Eye Res 53: 55-60, 1991.
- 57) LaVail MM: Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. Invest Ophthalmol Vis Sci 15: 64-70, 1976.
- 58) Jacobs GH, Fisher SK, Anderson DH, Silverman MS: Scotopic and photopic vision in the California ground squirrel: Physiological and anatomical evidence. J Comp Neurol 224: 209 -228, 1976.
- 59) Uehara F, Ohba N, Nakashima Y, Yanagita T, Ozawa M, Muramatsu T: Distribution of peripherin/rds mRNA in cone-dominant squir-rel retina. Exp Eye Res 56: 611-613, 1993.
- 60) Svensson EC, Conley PB, Paulson JC: Regulated expression of  $\alpha 2,6$ -sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP. J Biol Chem 267: 3466 -3472, 1992.
- 61) 上原文行,大庭紀雄,Yasumura D, LaVail MM: 網膜光受容体間基質分布の光応答の型分類.日眼 会誌 95:445-448,1991.
- 62)上原文行,大庭紀雄,Yasumura D, LaVail MM: 遺伝性視細胞変性網膜光受容体間基質分布の光応 答.日眼会誌 96:473-478, 1992.
- 63) Hargrave PA: The amino-terminal tryptic peptide of rhodopsin. A glycopeptide containing two sites of oligosaccharide attachment. Bio-

chim Biophys Acta 492: 83-94, 1977.

- 64) Heller J: Structure of visual pigments I. Purification, molecular weight and composition of bovine visual pigment<sub>500</sub>. Biochemistry 7: 2906-2913, 1968.
- 65) O'Brien PJ: Rhodopsin as a glycoprotein: A possible role for the oligosaccharide in phagocytosis. Exp Eye Res 23: 127-137, 1976.
- 66) Fukuda MN, Papermaster DS, Hargrave PA: Rhodopsin carbohydrate: Structure of small oligosaccharides attached at two sites sites near the NH<sub>2</sub> terminus. J Biol Chem 254: 8201 -8207, 1979.
- 67) Smith SB, St Jules RS, O'Brien PJ: Transient hyperglycosylation of rhodopsin with galactose. Exp Eye Res 53: 525-537, 1991.
- 68) Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann Rev Biochem 54: 631-664, 1985.
- 69) Kutty, G, Veen T, Nickerson J, Si J-S, Chader G, Wiggert B: Effect of light deprivation on IRBP gene expression in the mouse eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1399, 1992.
- 70) Uehara F, Ohba N, Unoki K, LaVail MM: Roles of sialoglycoconjugates in the rodassociated interphotoreceptor matrix. In: Shimizu K (Ed): Current Aspects in Ophthalmology. Elsevir Science Publishers BV, Amsterdam, 907-910, 1992.
- 71) Copenhagen DR, Owen WG: Coupling between rod photoreceptors in a vertebrate retina. Nature 260: 57-59, 1976.
- 72) Borgula GA, Karwoski CJ, Steinberg RH: Light-evoked changes in extracellular pH in frog retina. Vision Res 29: 1069-1077, 1989.
- 73) Yamamoto F, Borgula GA, Steinberg RH: Effects of light and darkness on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. Exp Eye Res 54: 685-697, 1992.
- 74)内匠勝秀,上原文行,鮫島宗文,大庭紀雄:網膜下 腔レクチン注入によりひき起こされる網膜変化. あたらしい眼科 3:575-577,1986.
- 75)内匠勝秀,上原文行,鮫島宗文,大庭紀雄:網膜下腔レクチン注入によりひき起こされる網膜変化, 第Ⅱ報.あたらしい眼科 4:137-139,1987.
- 76) Fliesler SJ, Rayborn ME, Hollyfield JC: Membrane morphogenesis in retinal rod outer segments: Inhibition by tunicamycin. J Cell Biol 100: 574-587, 1985.
- 77) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Takumi K, Unoki K, Muramatsu T, et al: Nucleotideinduced retinal changes. In: LaVail MM, et al(Eds): Inherited and Environmentally Induced

1392

Retinal Degeneration. Alan R Liss, New York, 577-584, 1989.

- 78) Connell G, Bascom R, Molday L, Reid D, McInnes R, Molday RS: Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. Proc Natl Acad Sci USA 88: 723-726, 1991.
- 79) Hawkins RK, Jansen HG, Sanyal S: Development and degeneration of retina in rds mutant mice: Photoreceptor abnormalities in heterozygotes. Exp Eye Res 41: 701-720, 1985.
- 80) Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG: Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (*rds*). Nature 338: 70-73, 1989.
- 81) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singth R, Humphries MM, Sharp EM, et al: A three-base-pair deletion in the peripherin-*RDS* gene in one form of retinitis pigmentosa. Nature 354: 478-480, 1991.
- 82) Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP: Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. Nature 354: 480-482, 1991.
- 83) Yanagita T, Uehara F, Nakashima Y, Ozawa M, Muramatsu T, Ohba N: Demonstration of peripherin/rds mRNA in normal and lightdamaged rat retinas by in situ hybridization histochemistry. Jpn J Ophthalmol 37: 1-8, 1993.
- 84) Mullen RJ, LaVail MM: Two new types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. Nature 258: 528-530, 1975.
- 85) Slavkin HC: Combination process for extracellular matrix influences on gene expression: A hypothesis. J Craniofac Genet Dev Biol 2: 179–189, 1982.
- 86) Bissell MJ, Aggler J: Dynamic reciprocity: How do extracellular matrix and hormones direct gene expression? In: Cabot M (Ed): Mechanisms of Transduction by Hormones and Growth Factors. Alan R Liss, New York, 251 -262, 1987.
- 87) Murphy BC, Pienta KJ, Coffey DS: Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and function of human prostate cancer cells. Prostate 20: 29 -41, 1992.

- 88) Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. Nature 343: 364-366, 1990.
- 89) Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347: 83-86, 1990.
- 90) Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Photoreceptor rescue in retinal degenerations by basic fibroblast growth factor. In: Hollyfield JG, et al (Eds): Retinal Degenerations. CRC Press, Florida 101-108, 1991.
- 91) 伊佐敷靖, 鵜木一彦, 伊佐敷誠, 大庭紀雄: 網膜色 素変性症に対する呼吸鎖補完療法の臨床効果. あ たらしい眼科 7:936-938, 1990.
- 92) 玉井嗣彦:網膜色素変性症.東 郁郎(編):図説 眼科治療方針,上巻,メジカルビュー社,東京,130 -131,1988.
- 93) 松尾信彦:眼底変性疾患の診かたと治療.日本の 眼科 61:1029-1051,1990.
- 94) Yao X-Y, Hageman GS, Marmor MF: Retinal adhesiveness is weakened by enzymatic modification of the interphotoreceptor matrix *in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 2051 -2058, 1990.
- 95) Gillespie W, Kelm S, Paulson JC: Cloning and expression of the Gal β1,3GalNAcα2,3sialyltransferase. J Biol Chem 267: 21004 -21010, 1992.
- 96)山村研一,相沢慎一:トランスジェニック・マウス.村松 喬,他(編):トランスジェニック・バイオロジー.講談社,東京,127-164,1989.
- 97) Larsen RD, Rajan VP, Ruff MM, Kukowska-Latallo J, Cummings RD, Lowe JB: Isolation of a cDNA encoding a murine UDP galactose: β-D-galactosyl-1,4-N-acetyl-Dglucosaminide α-1,3-galactosyltransferase: Expression cloning by gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8227-8231, 1989.
- 98) 鵜木一彦,上原文行,村松寿子,村松 喬,大庭紀 雄:網膜色素変性症患者リンパ球におけるシアリ ルトランスフェラーゼ酵素活性およびガラクトシ ルトランスフェラーゼ酸素活性。日眼会誌 91: 1286-1290, 1987.