

## In situ hybridization 法によるラット角膜 Mn-SOD mRNA の局在

松尾 裕文, 中村 誠, 片上千加子, 山本 節

神戸大学医学部眼科学教室

## 要 約

In situ hybridization 法によりラットの角膜における manganese superoxide dismutase mRNA (Mn-SOD mRNA) の発現細胞の局在を検討した。Mn-SOD cDNA プロブを polymerase chain reaction 法により合成し、ラット脳から抽出した全 RNA に対して slot blot 解析を行い、ラット Mn-SOD mRNA とハイブリッドを形成することを確認した。<sup>3</sup>H-dCTP で標識した Mn-SOD cDNA プロブを用いて生理的環境下飼育中の成熟ラット角膜凍結切片 (10 μm) に対して in situ hybridization (42°C, 20 時間) を行った。その結果、

角膜上皮基底細胞に Mn-SOD mRNA の発現を認めた。生理的条件下においても角膜に Mn-SOD mRNA の発現が確認されたことから、角膜上皮は常に活性酸素によるストレス下にあり、それに対する生体防御機構の一部として Mn-SOD を産生していると考えられた。(日眼会誌 99: 749-754, 1995)

キーワード: フリーラジカル, 活性酸素, Mn-SOD, ラット角膜, In situ hybridization

## Localization of Mn-SOD mRNA in Rat Cornea by In Situ Hybridization

Hirofumi Matsuo, Makoto Nakamura, Chikako Katakami  
and Misao Yamamoto

Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine

## Abstract

We investigated the localization of Mn-SOD mRNA in the rat cornea under physiological conditions using in situ hybridization. A Mn-SOD cDNA probe was synthesized by polymerase chain reaction. Slot blot analysis was performed to confirm that the cDNA probe hybridizes with rat Mn-SOD mRNA. Frozen sections of rat cornea were subjected to in situ hybridization using <sup>3</sup>H-labeled Mn-SOD cDNA probe. The results demonstrated the expression of

Mn-SOD mRNA in the rat corneal epithelial layer. We suggest that corneal epithelial cells are constantly exposed to active oxygen stress even under physiological conditions and synthesize Mn-SOD to protect themselves from the stress. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 749-754, 1995)

Key words: Free radical, Superoxide, Mn-SOD, In situ hybridization, Rat cornea

## I 緒 言

Superoxide dismutase (SOD) は活性酸素の1つであるスーパーオキシドを不活性化する酵素で生体内に広く存在し、活性酸素による組織障害から生体を防御する。近年、老化、糖尿病、虚血性疾患、炎症、癌などいろいろな病態の発症と進行に SOD が深くかかわっていることが明らかになってきた<sup>1)2)</sup>。眼科的にも白内障、糖尿病網膜症をはじめ、多くの疾患との関連が報告<sup>3)~6)</sup>されている。生体内で活性酸素そのものを捕えることは困難な

ため、活性酸素の不活性化酵素や活性酸素による組織障害産物である過酸化脂質の検索を中心に研究が進められており、SOD の眼球内局在についても明らかになっている。しかし、活性酸素ストレス下での生体防御機構として SOD がどのように発現されるのかを知るためには、免疫組織学的検索で SOD 蛋白の局在を示すだけでなく、蛋白合成の直接の根拠となる mRNA の発現を捕えることが重要な意味を持つと考えられる。今回我々は、Mn-SOD が活性酸素に対する生体防御機構にどのように関与しているのかを明らかにする目的で、in situ

別刷請求先: 650 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 松尾 裕文  
(平成6年8月15日受付, 平成7年2月24日改訂受理)

Reprint requests to: Matsuo Hirofumi, M.D. Department of Ophthalmology, Kobe University, School of Medicine,  
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received August 15, 1994 and accepted in revised form February 24, 1995)

hybridization (ISH) を用いてラット角膜における Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) mRNA 発現細胞の局在を検討した。

## II 実験方法

### 1. ラット Mn-SOD complimentary DNA (cDNA) プロープの合成

ラット Mn-SOD cDNA プロープは、既知のヒト Mn-SOD DNA 塩基配列を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) 法により合成した<sup>78)</sup>。まず、既知のラットおよびヒトの Mn-SOD DNA 塩基配列の相同性を調べたところ、ヒト Mn-SOD の 5'末端から 154~733 番目、ラット Mn-SOD の 5'末端から 183~649 番目の DNA 領域が 92% の相同性を有していた (表 1)。この約 570 bp の領域を PCR 法で合成した。

Sense primer として 5'-TAGGTGAACAACCTGA-ACGTC-3', antisense primer として 5'-ACATTCTCC-CAGTTGATTACA-3' を DNA シンセサイザー (Applied Biosystem, 391 DNA Synthesizer PCR-MATE) で合成し使用した。PCR 条件は始めに 95°C で 10 分間 denature させ、その後 denature 温度 95°C で 3 分間、反応温度 54°C で 5 分間、伸展温度 74°C 5 分間のサイクルを 30 回反復した。PCR 産物を精製し、アガロースゲル電気泳動法で単一バンドとして検出されることを確認した。さらに制限酵素切断を行い、生成物の確認を行った。設計した cDNA は GCATC の塩基配列をただ一か所だけ有している (表 1, 矢印)。この部位で PCR 生成物を制

限酵素切断すると、250 bp と 317 bp の塩基長を持つ DNA 鎖に切断されることが予想される。GCATC を認識し切断する制限酵素 *Sfa*NI (Biolabs, New England)

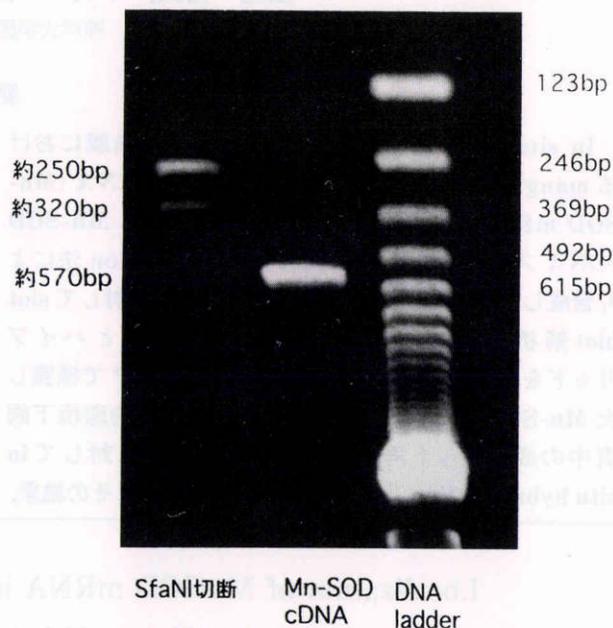


図1 Polymerase chain reaction (PCR) 産物の解析。1.5% アガロースゲル上で 123 bp DNA ladder (Life technologies, Inc) (右列), PCR 産物 (中列), 制限酵素切断後の PCR 産物を電気泳動した。PCR 産物は DNA ladder との比較から、約 570 bp の塩基長を持つ単一のバンドとして検出された。制限酵素切断後の PCR 産物は計画通り約 250 bp と約 320 bp の 2 本に分かれたバンドとして検出された。

表 1 Rat Mn-SOD cDNA 塩基配列

1	GCGCCTCAGC	AATGTTGTGT	CGGGCGGCGT	GCAGCGCGGG	CAGAAGACTG	GGCCCCGCGG
61	CCAGTACCGC	GGGCTCCCGG	CACAAGCACA	GCCTCCCTGA	CCTGCCTTAC	GACTATGGCG
121	CGCTGGAGCC	GCACATTAAC	GCGCAGATCA	TGCAGCTGCA	CCACAGCAAG	CACCACGCGA
181	CCTACGTGAA	CAATCTGAAC	GTCACCGAGG	AGAAGTACCA	CGAGGCGCTG	GCCAAGGGAG
241	ATGTTACAAC	TCAGGTTGCT	CTTCAGCCTG	CACTGAAGTT	CAATGGCGGG	GGCCATATCA
301	ATCACAGCAT	TTTCTGGACA	AACCTGAGCC	CTAAGGGTGG	TGGAGAACCC	AAAGGAGAGT
361	TGCTGGAGGC	TATCAAGCGT	GACTTTGGGT	CTTTTGAGAA	GTTTAAGGAG	AAACTGACAG
421	CTGTGTCTGT	GGGAGTCCAA	GGTTCAGGCT	GGGGCTGGCT	TGGCTTCAAT	AAGGAGCAAG
481	GTCGCTTACA	GATTGCCGCC	TGCTCTAATC	ACGACCCACT	GCAAGGAACC	ACAGGCCTTA
541	TTCCACTGCT	GGGGATTGAT	GTGTGGGAGC	ACGCTTACTA	TCTTCAGTAT	AAAAACGTCA
601	GACCTGACTA	TCTGAAAGCC	ATTTGGAATG	TAATCAACTG	GGAGAATGTT	AGCCAAAGAT
661	ACATAGTTTG	CAAGAAGTGA	AGCCCTTCCG	CCAGGCTGTG	TGTCAGGCCC	GTGGTGGGTG
721	TTTTGTAGTA	GTGTAGAGCA	TTGCAGCACT	GTGGCTGAGC	TGTTGTAATC	TTCATTGATG
781	CCTATCCACA	TATGTGTAAG	CATACAGTTA	TGATAATTTT	TTAATTAAT	GTATTGTTAG
841	GCAACTGTTT	GAGAACAGTA	CATACTGGT	GTGAGCTGCT	CTTGATTGAA	CATTTTCATT
901	AGAGGCTTGA	ATTGCTTGGA	CGCTGTCACT	GTCATCATAA	GGCCATCAAA	GATATCCAT
961	CTCTGTGTTG	GGGCCTGTGG	GGAGGCTGTA	ATCCTGTTCT	ACTGCAGTTA	GGAAAAAAT
1,021	GAGTTACCCC	CCCCCCCCAG	AATTGTTGAA	TAATAAAATA	GAGAACTGAA	TAGTTCTCTT
1,081	TTGTGTTAAA	AATTGCTATT	TTTCATAAGT	AATCCTTTGT	TTAGCGGATA	TCACCTAGTG
1,141	GTCTTTATTT	ATGGCCACAG	TTTCACAGAA	ACATCATTTT	TTCACTTGAA	ACGTGTAAC
1,141	GTCTTTATTT	ATGGCCACAG	TTTCACAGAA	ACATCATTTT	TTCACTTGAA	ACGTGTAAC
1,201	AGGCTAAGGA	TGGATGGAGT	GGTAGAGCCT	TGCGCTGTCT	TATGTGAGGC	CCTGGCTCT
1,261	ACCTCACTAC	TGAACAAATC	AACAGACCCA	AGCTAGGCTC	CTGACTGACA	ACTGTTAATT
1,321	CGGAGAGGAC	TGACATTGTG	CCTCTGGGTT	TTTTTATAGG	CTGAGATGCA	AAAACGTGTA
1,381	CCTTGTCTAT	TAAAACCGAC	TGTGTATTGT	ATGAAAGTGG	TCAAGATGGA	CAAAGTAT

を用いて制限酵素切断 (37°C, 60 分) を行い, アガロースゲル電気泳動を行った. 同時に DNA ladder (123 bp DNA ladder, GIBCO BRL) を泳動した (図 1).

## 2. Slot blot 解析

合成した Mn-SOD cDNA プロープが実際にラットが生体中で合成している RNA と, ハイブリッドを形成することを確認するための予備実験として slot blot 解析を行った. まず, Chomczynski ら<sup>9)</sup>の方法に準じてラット脳から全 RNA を抽出した. 全 RNA の 2 倍希釈系列を作成し, 20  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 2.5  $\mu$ g の全 RNA を 2 枚のニトロセルロース膜に吸着させ, 80°C で 2 時間乾燥させ固定した (図 2, 右から 1 列目と 3 列目). 一本鎖化したリニア化 pBR 322 の 2 倍希釈系列を同様の処置で 2 枚のニトロセルロース膜に固定した (図 2, 右から 2 列目と 4 列目). プロープとして合成したラット Mn-SOD cDNA をランダムプライム DNA 標識法でジコキシゲニン標識したものと, ジコキシゲニン標識リニア化 pBR 322 とを用いた. 全 RNA と pBR 322 をそれぞれ吸着させた 2 枚のニトロセルロース膜 (図 2, 右から 1 枚目と 2 枚目) に対して, Mn-SOD cDNA プロープを用いてフィルターハイブリダイゼーションを行った (42°C, 15 時間). 同様に, 全 RNA と pBR 322 をそれぞれ吸着させた 2 枚のニトロセルロース膜 (図 2, 右から 3 枚目と 4 枚目) に対しては, pBR 322 プロープを用いてフィルターハイブリダイゼーションを行った. ニトロセルロース膜を洗浄後, ジコキシゲニン-cDNA-mRNA hybrid の免疫学的検出を行った. 以上のハイブリダイゼーションおよび免疫学的検出操作に使用した溶液の組成および条件はキット内容に準じて行った (Genius TM Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit, Boeringer Mannheim Biochemicals).

## 3. ISH

実験には 12 時間明 (昼光ランプ下)/12 時間暗で飼育された体重 200 g の雄ラット (Wistar 系) を 5 匹使用した. 実験動物をペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) の腹腔内注射で麻酔後開胸し, 約 200 ml の 4% パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (PFA/PBS) で上行大動脈から灌流固定を行った. 灌流固定後, 直ちに両眼球を摘出し 30 分間同液で浸漬固定後, 角膜を分離し, さらに 2 時間浸漬固定した. 次いで PBS, 5% ショ糖溶液で組織を洗った後, 30% ショ糖溶液に 4°C で 12 時間浸漬し, OCT コンパウンドに凍結包埋した. 凍結切片の作製をクライオスタットを用いて行った. 切片の厚さは, 10  $\mu$ m とし, poly-L-lysine 被膜処理したスライドガラスに載せ, 伸展板上で 30 分乾燥した後, -80°C で保存した. Mn-SOD cDNA をランダムプライム DNA 標識法を用いて <sup>3</sup>H-dCTP で標識した (Random Primer DNA Labeling Kit, Takara Biomedicals). <sup>3</sup>H 標識 cDNA プロープの放射活性は約  $4.0 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ l であつ

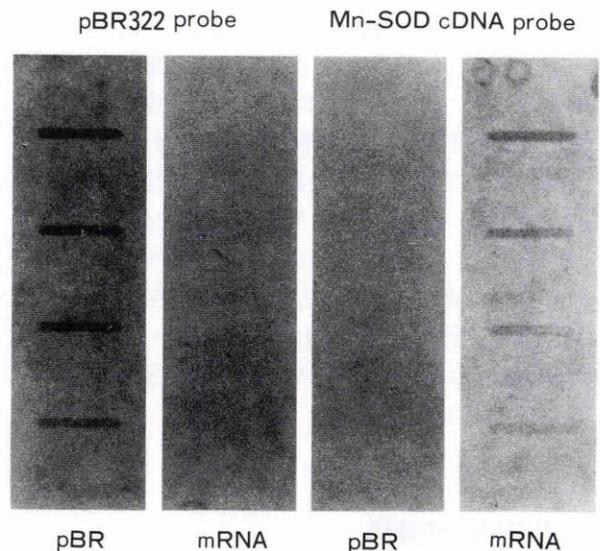


図 2 Slot blot 解析.

ラット脳抽出全 RNA に対して manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) complementary DNA (cDNA) プロープを用いたフィルターハイブリダイゼーションを施行したニトロセルロース膜には, 吸着させた全 RNA 量に対応した色素濃度の陽性バンドが検出された (最右例). 陽性対照である pBR 322 に対する pBR 322 プロープでのハイブリダイゼーション (右から 4 列目) では陽性バンドが確認された. 陰性対象である pBR 322 に対する Mn-SOD cDNA プロープでのハイブリダイゼーション (左から 3 列目) とラット脳全 RNA に対する pBR 322 プロープでのハイブリダイゼーション (左から 2 列目) とでは陽性バンドは検出されなかった.

た. 乾燥凍結保存しておいた切片を PBS で洗浄後, proteinase-K 処理 (0.5  $\mu$ g/ml, 5 min) を行った. 4% PFA/PBS で後固定後水洗し, 70%, 95% エタノールで脱水した. 次に, プレハイブリダイゼーションを行った. プレハイブリダイゼーション溶液の組成は, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4), 50% deionized formamide, 1 $\times$ Denhard's, yeast-t RNA (0.5 mg/ml), salmon-sperm-DNA (0.25 mg/ml) である. この溶液を 5 分間沸騰浴後, 急冷処理した後, 直ちに各切片に載せ, 42°C で 2 時間プレハイブリダイゼーションさせた. 次に, ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション溶液の組成は, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4), 40% deionized formamide, 1 $\times$ Denhard's, yeast-t RNA (0.25 mg/ml), SS-DNA (0.125 mg/ml), 10% dextran sulfate に <sup>3</sup>H 標識 cDNA プロープ (0.1 ng/ $\mu$ l) を含むものとした. この溶液を 5 分間沸騰浴後, 急冷処理した後, 直ちに各切片に 100  $\mu$ l ずつを載せ, 湿箱中で 42°C, 20 時間ハイブリダイゼーションさせた.

ハイブリダイゼーション後, 0.5 $\times$ SSC, 0.2 $\times$ SSC で室温洗浄 5 分 $\times$ 2 回, SI nuclease 処理後, 0.5 $\times$ SSC で

55°C 5分×2回ずつ洗浄した。その後、70%、95%アルコールで脱水し、乾燥させた。次いで、既報<sup>10)</sup>に準じてオートラジオグラフィを行った。切片を暗箱中で4°C、3週間露出した後現像し、ヘマトキシリン・エオジン染色で対比染色した後鏡検した。対照反応としてcDNAプローブを加えずに同様の過程を処理したものと、組織切片をRNase処理した後、同様の過程を行ったものについて検討した。以上に使用した各溶液には、混入RNaseの活性を抑える目的で、RNase阻害剤であるdiethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma, St. Louis)を0.02%濃度で加えた。

### III 結 果

#### 1. PCR産物の確認

精製後のPCR産物はアガロースゲル上に単一バンドとして存在した。同時に泳動したDNA ladderとの比較によりPCR産物は約570 bpの長さを持つことが確認された。制限酵素 (*Sfa*NI) 切断された精製後のPCR産物はDNA ladderとの比較から計画通りの塩基長(250 bp, 317 bp)を持つバンドに切断されていることが確認された(図1)。このことから、我々の合成したcDNAは予定したDNA領域(表1)が増幅されたものであると考えられた。

#### 2. Slot blot 解析

ラット脳全RNAに対してジコキシゲニン標識Mn-SOD cDNAプローブを用いたフィルターハイブリダイゼーションを施行したニトロセルロース膜には、吸着させた全RNA量に対応した色素濃度の陽性バンドが検出された(図2, 最右列)。陽性対照であるpBR 322に対す

るpBR 322プローブでのハイブリダイゼーション(図2, 右から4列目)では陽性バンドが確認された。陰性対象であるpBR 322に対するMn-SOD cDNAプローブでのハイブリダイゼーション(図2, 左から3列目)と、ラット脳全RNAに対するpBR 322プローブでのハイブリダイゼーション(図2, 左から2列目)では陽性バンドは検出されなかった。以上の結果から、合成したMn-SOD cDNAは実際にラットが生体中で合成するRNAとハイブリッドを形成すること、およびラット脳から抽出した全RNA中に合成Mn-SOD cDNAプローブとハイブリッドを形成するRNAがあることが確認された。

#### 3. ISH

ラット角膜凍結切片に対してISHによりMn-SOD mRNAの検出を試みた結果、オートラジオグラフィで可視化された<sup>3</sup>H標識Mn-SOD cDNAプローブ-mRNAハイブリッドの存在が示された。明視野オートラジオグラフィにおいて、角膜上皮細胞に銀粒子の集積を認めた(図3)。角膜上皮細胞のうち、基底細胞層から翼細胞層にかけて一様に高密度の銀粒子の集積が認められた。角膜実質細胞には銀粒子の集積は明らかではなかった。対照切片では銀粒子が一様に疎らに存在するのみで陽性所見は認められなかった(図4)。このことから、角膜上皮にMn-SOD mRNAが発現していることが明らかになった。角膜中央部と角膜周辺部との部位による発現の差は認められなかった。5匹の実験動物の個体差による発現の違いは認められなかった。

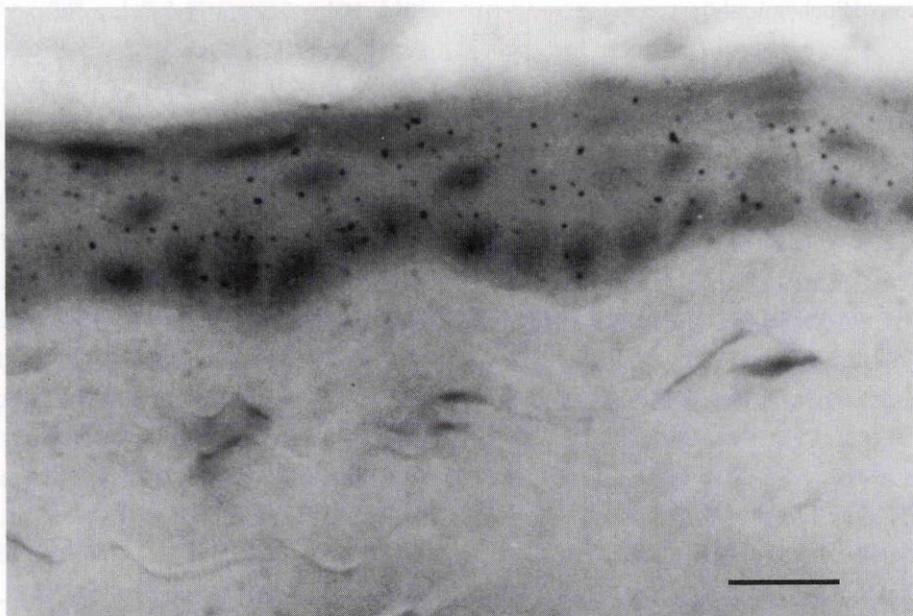


図3 Mn-SOD cDNAプローブを用いたin situ hybridization (ISH) 施行眼(ヘマトキシリン対比染色)。角膜上皮層を中心に点状の銀粒子の集積が認められた。角膜実質層にはほとんど銀粒子の集積は認められなかった。バーは20  $\mu$ m

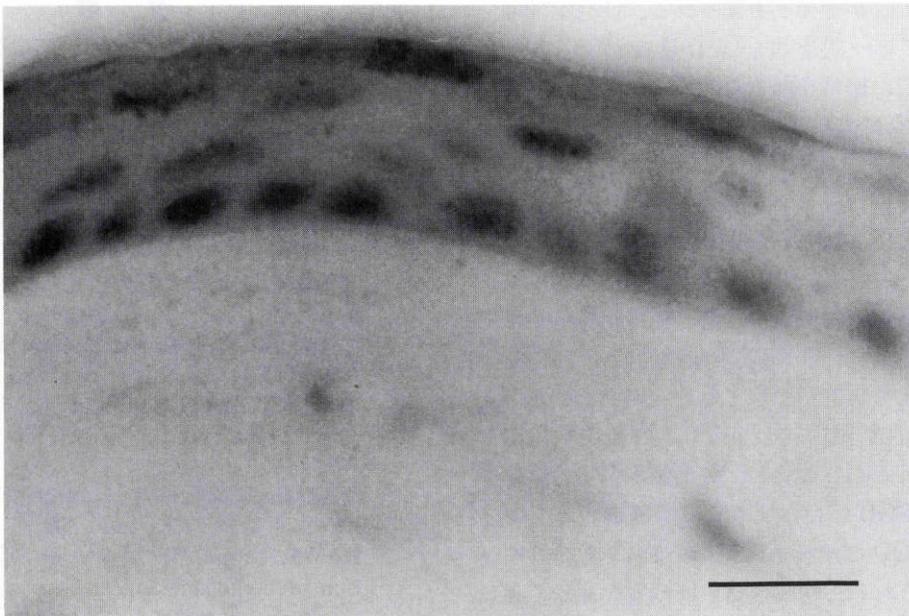


図4 RNase 処理後切片に対する ISH 施行眼 (ヘマトキシリン対比染色)。  
角膜上皮, 角膜実質に銀粒子の集積は認められなかった。バーは 20  $\mu$ m

#### IV 考 按

好気性生物は呼吸や代謝に分子状酸素を有効に利用しているが、好气的環境下でこの生命活動を営む限り必然的に活性酸素が生じる。このため、好気性生物は常に活性酸素による組織障害の危険にさらされていると考えられる。無秩序に生じた活性酸素による組織障害を防ぐために、生体は活性酸素に対する強力な防御機構を備えている。抗酸化剤であるビタミンEやアスコルビン酸、抗酸化酵素であるSOD、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)、カタラーゼなどはその代表である。活性酸素に対する防御機構と発生する活性酸素のバランスが崩れ、活性酸素が過剰になると生体の重要な構成成分である脂質が中心的に過酸化され、その生理作用が失われる。また、一部では核酸や蛋白質にも変性が起こる。活性酸素の中でもスーパーオキシドは金属イオンの存在下で、ハーバーワイス反応により強い組織障害能力を持つヒドロキシラジカルを生じることから、生体内でまず第一に消去しなければならない活性酸素と考えられる。このスーパーオキシドの不活性化反応を触媒する酵素がSODであり、生体防御機構の中でその働きは重要である。SODにはCu, Zn-SOD, Mn-SOD, extracellular SODの3種アイソザイムが存在する。Cu, Zn-SODとMn-SODは細胞内局在が異なり、同じ反応を触媒するものの、恐らく何らかの役割分担があるものと考えられる。例えば、Cu, Zn-SODは脳幹、肝臓、腎臓、副腎、精巣に多く、蛋白量もMn-SODの5~10倍量存在することから、生体の生命活動に伴い常に発生するスーパーオキシドの不活性化に中心的な役割を果たしていると考えられている<sup>11)</sup>。一方、Mn-SODはミトコンドリアに局在

し、TNF, IL-1をはじめ様々なサイトカインによりmRNAが誘導されることが報告<sup>12)13)</sup>され、活性酸素に対する細胞防御反応の点で重要であると考えられている。Extracellular SODの病態的意義についてはほとんど不明である。活性酸素は一般に反応性が高く、種類によっては半減期そのものが非常に短いこと、強力な防御機構によりすぐに不活性化されることなどの理由から、生体内で活性酸素そのものを測定することが困難であり、いくつかの手法が試みられているが、特異性に乏しく測定法が確立しているとはいいがたい<sup>14)</sup>。このため、活性酸素による生体障害の研究には活性酸素による組織障害産物の中心である過酸化脂質の局在、定量やあるいはSODを始めとする活性酸素不活性化酵素の活性測定、免疫組織化学による局在、ELISAによる蛋白定量などが行われてきた。その結果、SODは老化、糖尿病、虚血性疾患、炎症、癌などいろいろな病態に深くかかわっていることが明らかになってきており<sup>12)</sup>、眼科的にも白内障、糖尿病網膜症をはじめ多くの疾患との関連が報告<sup>3)~6)</sup>されている。活性酸素存在下でのSODの組織内局在は興味深いところであり、今回使用した実験動物であるラットについてもヒトと同様に3種類のアイソザイムが存在すること<sup>15)</sup>、その眼球内局在については免疫組織化学的にラット角膜上皮、虹彩、水晶体、網膜に存在することが示されている<sup>16)</sup>。しかし、ELISAによる免疫学的な定量と活性測定法を比較する方法によりSODは病的状態で活性が低下し、その状態で蓄積される可能性が示唆され、この活性の落ちたSODの増加が老化や糖尿病による合併症などにかかわっている可能性が示されている<sup>2)</sup>。このため、病的状態での生体反応を考えるうえではSODの定量や局在の検討のみでは不十分であり、SODの合成

そのものを捕えることが必要と考えられる。今回我々は、Mn-SOD cDNA プローブを用いて ISH を行い、Mn-SOD mRNA の発現の検索を試みた結果、生理的環境下飼育中のラット角膜において Mn-SOD mRNA の発現を確認した。一般に、蛋白は生体内で DNA → mRNA → スプライシング → 蛋白合成という過程を経て合成、蓄積されるため、組織内で mRNA を検出することは蛋白合成の初期段階を捕えることになり、その検出部位で、その時点での蛋白合成を意味する。一方、免疫組織化学による蛋白の検出は、蛋白合成の最終生成物を捕えており、そこに蛋白が存在する事実を示している。現在までに角膜を含め眼球組織内で Mn-SOD mRNA の発現が捕えられたとする報告はみられないが、免疫組織化学的にはラット角膜上皮に SOD が存在することが報告されていることから、Mn-SOD は角膜上皮で合成され、その場に蓄積されと考えられる。角膜は薄い涙液層を介して直接外気と接しているため、酸素ストレスや光ストレスによる影響を受けやすい環境にある。地表に降り注ぐ太陽光線には種々の波長の光が含まれるが、波長が 295 nm 以下の遠紫外線および近紫外線の一部はほとんどが角膜で吸収される。遠紫外線は水中で水和電子を介してスーパーオキシドを発生させ、また、近紫外線によりフォトダイナミック作用を介してスーパーオキシド、一重項酸素が発生し得る<sup>17)</sup>ため、光ストレスの影響は大きいと考えられる。一方、Mn-SOD はストレスに対して mRNA が誘導される一種のストレス蛋白としての性格を有している。今回の実験結果は、角膜は日常的にスーパーオキシドによる組織障害の危険にさらされていること、角膜のスーパーオキシドに対する防御反応の過程に Mn-SOD が関与していること、および角膜上皮は日常的に Mn-SOD の合成を行っていることを示すものと考えられる。ラット角膜上皮にはスーパーオキシドに対する生体防御機構が存在し、その一部として Mn-SOD の合成が生理的条件下でも行われていることが証明された。オゾン層の破壊が進行すれば、太陽自然光中の紫外線が急激に増える予想される。現在、活性酸素の発生による角膜組織障害についての報告はみられないが、今後、活性酸素防御機構の破綻により生じる疾患についての研究が重要であると考えられる。活性酸素に対する生体防御機構を総合的に把握していくためには Mn-SOD だけでなく、他の重要な活性酸素不活性化酵素である Cu, Zn-SOD, GSHPx, カタラーゼなどについても、mRNA の発現について明らかにしていくことが必要であると考えられた。ISH 法は各種のストレスに対する直接の反応として、蛋白合成を捕えられる点で活性酸素に対する生体防御機構を解明して行くうえで有用な手法であると考えられた。

## 文 献

- 1) Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991.
- 2) 鈴木敬一郎, 谷口直之: 抗酸化酵素の発現と病態—SOD. *実験医学* 9: 1317-1330, 1991.
- 3) Nishida T, Nakagawa S, Manabe R: Superoxide dismutase activity in diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol* 28: 377-382, 1984.
- 4) 石橋達朗: 糖尿病性網膜症とフリーラジカル. *活性酸素フリーラジカル* 4: 193-198, 1993.
- 5) Yamashita H, Horie K, Yamamoto T, Nagano T, Hirano T: Light-induced retinal damage in mice hydrogen peroxide production and superoxide dismutase activity in retina. *Retina* 12: 59-66, 1992.
- 6) 平光忠久: 網膜鉄錆症と過酸化脂質. *活性酸素フリーラジカル* 3: 426-434, 1992.
- 7) Ho YS, Crapo JD: Isolation and characterization of complementary DNAs encoding Human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett* 229: 256-260, 1988.
- 8) Ho YS: Nucleotide sequence of cDNAs coding for rat manganese-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* 15: 10070-10070, 1987.
- 9) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159, 1987.
- 10) Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M: Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1837-1845, 1991.
- 11) Kurobe N, Kato K: Sensitive immunoassay for rat Mn superoxide dismutase: Tissue distribution and developmental profiles in the rat central nervous tissue, liver, and kidney. *Biomedical Res* 12: 97-103, 1991.
- 12) Wong GHW, Elwel JH, Oberley LW, Goeddel DV: Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923-931, 1989.
- 13) Wong GHV, Goeddel DV: Introduction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science* 242: 941-944, 1988.
- 14) Takahashi A, Nakano M, Mashiko S, Inaba H: The first observation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in situ lungs of rats treated with drugs to induce experimental acute respiratory distress syndrome. *FEBS Lett* 261: 369-372, 1990.
- 15) Kurobe N, Kato K: Sensitive enzyme immunoassay for rat Mn superoxide dismutase: Tissue distribution and developmental profiles in the rat central nervous tissue, liver, and kidney. *Biomedical Res* 12: 97-103, 1991.
- 16) Rao NA, Larry GT, Delmage JM, Sevanian A: Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1778-1781, 1985.
- 17) 伊藤 敦: 紫外線による活性酸素の発生. *活性酸素フリーラジカル* 4: 6-12, 1993.