

原著

mRNA プロファイリングを用いた RCS ラットの網膜変性に対する ニルバジピンの保護作用の解析

佐藤元哉¹⁾ 大黒浩¹⁾ 大黒幾代¹⁾
高野淑子¹⁾ 山崎仁志¹⁾ 目時友美¹⁾
宮川靖博¹⁾ 石川太¹⁾ 間宮和久¹⁾
中澤満^{1,2)}

抄録 カルシウム拮抗剤であるニルバジピンが RCS ラットの網膜変性を遅延させるメカニズムを解明するため、ニルバジピン投与後の遺伝子発現の変化を mRNA プロファイリング、免疫組織化学およびウエスタンブロット法を用いて検討した。ニルバジピン投与および非投与の RCS ラットの網膜を DNA マイクロアレイ法によるスクリーニングにて解析したところ、1101 個の遺伝子中、21 個の遺伝子が有意に発現変化しており、この中にはアポトーシスに関連する遺伝子が含まれていた。また、有意に発現増加した遺伝子の中には、神経細胞のアポトーシスへの抑制的作用がある fibroblast growth factor 2 (FGF2) と activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) が含まれていた。そこで、FGF2 と Arc の二者に注目し、ニルバジピン投与による両者のタンパクレベルでの発現を確認するため免疫組織染色法およびウエスタンブロット法にて解析したところ、両者の発現が網膜にて増加していることが確認された。本研究の結果から、ニルバジピン投与により内因性の FGF2 および Arc の発現を増加させることが判明し、これらがニルバジピンの視細胞保護効果に関与している可能性が示唆された。

弘前医学 55: 49-55, 2004

キーワード: DNA マイクロアレイ; ニルバジピン; FGF2; Arc; 網膜色素変性; RCS ラット.

ORIGINAL ARTICLE

PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF NILVADIPINE-INDUCED PRESERVATION OF RETINAL DEGENERATION IN RCS RAT ANALYZED BY MRNA PROFILING ASSAY

Motoya Sato¹⁾, Hiroshi Ohguro¹⁾, Ikuyo Ohguro¹⁾, Yoshiko Takano¹⁾,
Hitoshi Yamazaki¹⁾, Tomomi Metoki¹⁾, Yasuhiro Miyagawa¹⁾,
Futoshi Ishikawa¹⁾, Kazuhisa Mamiya¹⁾, and Mitsuru Nakazawa^{1,2)}

Abstract To elucidate mechanisms of Ca²⁺ antagonist, nilvadipine induced photoreceptor preservation we analyzed altered gene expressions of the retina in RCS rats administrated nilvadipine by mRNA profiling assay. Total RNA isolated from the retina with or without nilvadipine was converted into cDNA. Utilizing DNA microarray analysis methods, we compared the overall expression patterns for 1101 genes that were commonly expressed in rodent. Subsequently, immunohistochemistry and western blot analysis were performed to confirm specific changes observed in the microarray analysis. In the total of genes, the expressions of 21 genes were altered significantly including several genes related with apoptotic pathway. Remarkably, neurotrophic factor, fibroblast growth factor 2 (FGF2) and activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc), known to suppress the apoptosis in the central nervous system were up-regulated. Immunohistochemistry and western blot analysis revealed more intense staining in nilvadipine-treated retinas for FGF2 and Arc than control rat's retina. Based upon these data, it is suggested that systemic administration of nilvadipine to RCS rats increases the expression of endogenous FGF2 and Arc in retina, and potentially have protective effect to the retinal degeneration.

Hirosaki Med. J. 55: 49-55, 2004

Key words: DNA microarray; nilvadipine; FGF2; Arc; retinal degeneration; RCS rat.

¹⁾ 弘前大学医学部眼科学教室

²⁾ 別刷請求先: 中澤 満
平成 14 年 12 月 3 日受付
平成 15 年 12 月 10 日受理

¹⁾ Department of Ophthalmology, Hirosaki University
School of Medicine

²⁾ Correspondence: M. Nakazawa
Received for publication, December 3, 2002
Accepted for Publication, December 10, 2003

緒 言

網膜色素変性は遺伝性, かつ進行性に網脈絡膜変性をきたし失明にいたる難病である. 近年の分子生物学的研究の発展に伴い, 多数の網膜特異的遺伝子が本症の原因として同定され, その知見は集積されつつある¹⁾. また, 本症ではアルツハイマー病など, 他の中樞神経変性疾患と同様, アポトーシスによる視細胞死が生じていることなども明らかとなっている²⁾. しかし, 詳細な分子病態は不明で, 有効な治療法は確立されていない.

本症の病態治療研究には, 以前から網膜変性モデル動物が用いられている. The Royal College of Surgeons (RCS) ラットは, 最もよく研究されている網膜変性モデル動物の一つである³⁾. RCS ラットでは網膜色素上皮が原発性に傷害されており, 先天的に網膜視細胞の貪食機能が障害されていることが病理学的検討から判明している^{4, 5)}. すなわち, 生後約3週令から網膜変性が始まり, 約一ヶ月で形態的に視細胞外層は完全に消失する.

最近, D'Cruz ら⁶⁾ は, RCS ラットの網膜変性の原因が, 網膜色素上皮細胞による視細胞外節の貪食に関与する *Mertk* 遺伝子の異常であることをつきとめた. さらに Gal ら⁷⁾ により, ヒトの網膜色素変性患者の一部においても *MERTK* 遺伝子の異常が確認された. この事実は, RCS ラットはヒトの網膜色素変性そのもののモデルであることを示しており, RCS ラットを用いた網膜変性に対する治療研究がヒトにも応用できる可能性があると考えられる.

最近, 我々の研究グループは RCS ラットにカルシウム拮抗剤であるニルバジピンを投与したところ形態的, および機能的に網膜変性の抑制効果がみられたことを報告し⁸⁾, 本症の治療としてカルシウム拮抗剤による薬剤治療が有効である可能性を示唆した. しかし, カルシウム拮抗剤であるニルバジピンがどのような機序で網膜保護効果を発揮するのかについての詳細な

分子機構は明らかでなく, 本薬剤の臨床応用のためには更なる検討が必要と考えられる. そこで, 本研究ではニルバジピンが RCS ラットの網膜変性を遅延させるメカニズムを解明するため, 近年, 注目されている DNA マイクロアレイ法を用いた解析を行った.

方 法

本研究におけるすべての動物実験は弘前大学動物実験指針に沿って行われた.

動物の麻酔

本研究において, 生後3~5週令の RCS (rdy-/-) ラット(クレア社)を12時間明暗周期で飼育したものを使用した. 麻酔に際しては, ジエチルエーテルを用い, 覚醒がみられた場合, 適宜, ケタミン (80~125 mg/kg) とキシラジン (9~12 mg/kg) の混合液を筋肉注射した. tail clamping 法により麻酔の深さを確認した.

ニルバジピンの投与

ニルバジピン(藤沢薬品工業)をエタノール: ポリエチレングリコール400: 蒸留水 (2:1:7) で濃度が0.1 mg/ml になるように溶解し, これをさらに生理食塩水で2倍に希釈したものを腹腔内に1.0 ml/kg の量で, 14日間連日投与した. コントロールとして, 基剤のみを投与した. このニルバジピンの投与濃度は, ヒトの高血圧症患者へ臨床的に投与している一日あたりの量 (0.05~0.3 mg/kg)⁹⁾ とほぼ同様である.

DNA マイクロアレイ法

ニルバジピン投与による網膜での遺伝子発現プロファイルを得るため DNA マイクロアレイ法によるスクリーニングを行った. 生後3週令の RCS ラットに, ニルバジピンまたは基剤を14日間連続で腹腔内投与した後, 眼球摘出した. 摘出網膜は, それぞれ4眼 (RCS ラット2匹) を使用した. 摘出網膜から5 µg の mRNA を抽出, SuperScript II RNase H Reverse

Transcriptase (Life テクノロジー) (20U) を用い 1 μ l (0.5mg/ml) T7-oligo (dT) プライマー (5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACCCTATAGGGCGT-3') 存在下で 42°C 1 時間反応させ一本鎖 cDNA を合成した。

次に, 4 μ l DNAPolymerase I, 1 μ l RNase H 存在下で 16°C 2 時間インキュベート後, 2 μ l T4 DNAPolymerase を加えさらに 10 分間インキュベートし, 二本鎖 cDNA は 150 μ l フェノールクロロホルムでタンパク除去後, 抽出した。RNA の増幅には T7 Transcription Kit (Epicentre Technologies) を用い, T7 RNA polymerase 存在下で 42°C 3 時間インキュベートした。増幅された RNA は, Cy3, Cy5 蛍光色素で標識し, 50°C 16 時間 Atras Fluorescent Labeling Kit (Clontech) へハイブリダイズさせた。その後, マイクロアレイを洗浄, 乾燥させ, スキャナにて蛍光を検出した。遺伝子はすでにラットでの発現が確認されている 1101 個の遺伝子を対象とし, 発現比率はコントロールと比較して 2 倍以上の変化を有意とした。なお, mRNA 抽出から以後の実験操作は外部検査機関 (Clontech) へ委託した。

免疫組織染色法

ニルバジピン投与, および非投与の RCS ラット (生後 5 週令: 各 2 匹) を用いた。

麻酔下で, 300 ml の 4% paraformaldehyde を含む, 0.1 M phosphate buffer (PH7.4) で還流固定した後, 眼球を摘出, パラフィン包埋し, 視神経を通る垂直面での約 4 μ m の網膜組織切片を作成した。切片を脱パラフィンした後, 5% ヤギ血清および 3% ウシ血清アルブミンを含む PBS にて 1 時間ブロッッキングを行った。一次抗体として抗 FGF2 (fibroblast growth factor 2, 1:100) または抗 Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein, 1:100) 抗体 (サンタクルズ社) を 4°C, overnight でインキュベートした。各切片を PBS で 5 分間 3 回洗浄し, 二次抗体として FITC (fluorescein-isothiocyanate)

標識抗ウサギ IgG (1:100, Dako) にて, 室温で一時間インキュベートした。組織切片の観察に際しては, 免疫蛍光顕微鏡 (model BH II, オリパス社) を用い, 写真は視神経から 1-2 mm の場所で blue filter を使い撮影した。

ウエスタンブロット法

ニルバジピン投与, および非投与の RCS ラット (生後 5 週令: 各 1 匹) を用いた。

方法は既報に準じ⁸⁾。まず, 網膜 2 枚を 200 μ l の 0.5% Tween20 を含む 10 mM Hepes (PH7.5) 100 mM NaCl 中でホモジナイズした。各 10 μ l の試料を, SDS サンプル buffer (0.125 M Tris-HCl, PH6.8, 5% SDS, 20% グリセロール, 15 μ M BPB) で溶解し, SDS ポリアクリルアミドゲル (12.5%) 電気泳動を行い, 分離されたタンパクを 10% methanol を含む 10 mM bis-tris phosphate buffer (pH 8.4) 中の PVDF (Hybond-P) 膜へ転写した。PBS (phosphate-buffered saline) で溶解した 2% スキムミルクにて室温で 30 分間ブロッッキングした後, 1 次抗体および, HRP (horseradish peroxidase) 標識の 2 次抗体 (フナコシ) をそれぞれ室温で 2 時間反応させた。膜を 0.05% Tween20 を含む PBS で十分に洗浄後, 抗原抗体複合体をジアミノベンチジンと H₂O₂ を基質に用いて発色させた。

結 果

DNA マイクロアレイ法によるニルバジピン投与後の網膜遺伝子発現の変化

DNA マイクロアレイ法にて有意な発現変動を示した遺伝子は, 今回検討した 1101 個中, 21 個であり, 発現量が減少した遺伝子は 13 個, 発現量が増加した遺伝子は 8 個であった。(表 1)

発現量が減少した遺伝子の中には CD45¹⁰⁾, ErbA proto-oncogene¹¹⁾, J A K 2¹²⁾ (janus tyrosine-protein kinase2) などのアポトーシスに関連した遺伝子が含まれていた。他に, ホルモ

表1 DNA マイクロアレイ法での解析結果 RCS ラットへのニルバジピン投与により有意に発現変動した遺伝子

Down regulated genes	ratio	Possible roles	※文献
CD45 antigen	0.48	Apoptotic (tyrosine phosphatase)	10
ErbA proto-oncogene	0.26	Apoptotic	11
Janus tyrosine protein kinase 2 (JAK2)	0.43	Apoptotic	12
ADP-ribosyl cyclase 1	0.23	Ca ²⁺ metabolism	13
Voltage-gated K channel 3.4	0.39	Potassium channel	14
Taurine transporter	0.36	Possible neuroprotective factor	15
Apolipoprotein B mRNA editing protein	0.09	Plasma lipoprotein	16
Opioid receptor delta1	0.29	Risk factor for atherosclerosis Neurotransmitter receptor	17
Somatostatin receptor 4	0.34	Neurotransmitter receptor	18
Vasopression V2 receptor	0.21	Hormone receptor	19
Mineralocorticoid receptor	0.29	Hormone receptor	20
Renin	0.37	Homeostasis of blood pressure	21
Glypican 1	0.34	Regulator of FGF2	22
Upregulated			
Fibroblast growth factor 2 (FGF2)	2.72	Possible therapeutic factor for RCS retinal degeneration	23 ~ 29
Arc	2.27	Immediate early genes	30 ~ 32
Transducin β subunit	2.64	Phototransduction	33
Go α subunit	2.33	Signal transduction	34
Ral B	2.00	Ras-related GTP binding protein	35
Voltage-gated K channel protein 3.1	2.26	Potassium channel	36
Kidney oligopeptide transporter	2.73	Peptide transporter	37
Fructose-bisphosphate aldolase A	3.55	Muscle type aldolase	38

ンレセプター, ニューロトランスミッターレセプターなどが含まれていた。

発現量が増加した遺伝子の中には, 網膜視細胞に特異的な transducin を含むいくつかの G タンパクの増加がみられた。また, この中には細胞増殖に促進的に作用する成長因子である FGF2²⁴⁻³⁰⁾, 神経系に特異的に発現している遺伝子である Arc³¹⁻³³⁾ が含まれていた。

ニルバジピン投与による網膜での FGF2 と Arc の免疫組織学的所見とタンパクレベルでの発現量変化

FGF2 および Arc は, ともに神経細胞でのアポトーシスに対し保護的に作用する重要な因子

であることが知られていることから, 本研究ではこの2つの遺伝子発現増加に焦点を絞り, mRNA レベルのみならず, 組織, およびタンパクレベルでのニルバジピン投与による発現量変化を確認した。それぞれの特異抗体を用いた免疫組織染色法による解析では図1に示すように, FGF2, Arc とともにニルバジピン投与により視細胞層のみならず網膜各細胞層での発現が増加しており, 特に FGF2 については顕著であった。また, 両者のタンパクレベルでの発現量はウエスタンブロット法にて解析した。結果は図2に示すように FGF2 および Arc とともにニルバジピン投与により網膜でのタンパク発現量が増加していることが確認された。

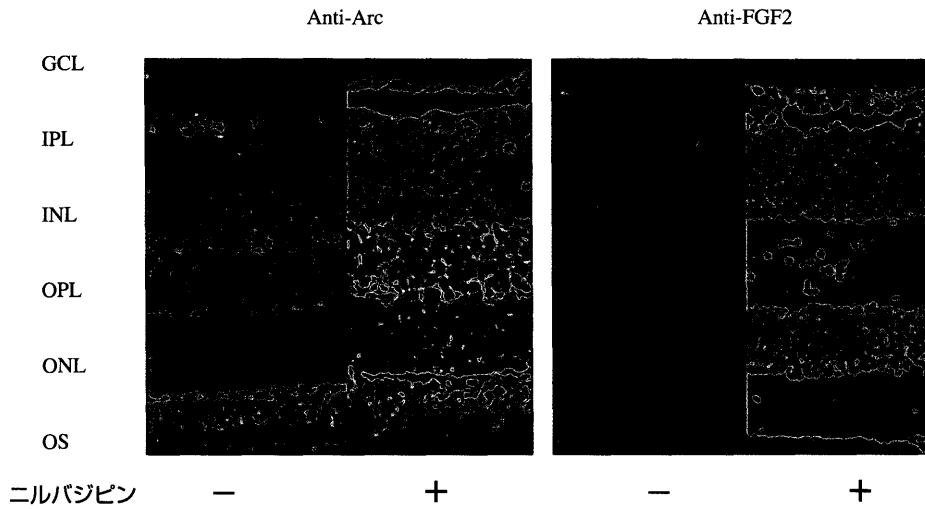


図1 ニルバジピン投与および非投与の RCS ラット網膜での抗 FGF2 抗体、抗 Arc 抗体を用いた免疫組織染色法での結果 FGF2, Arc ともニルバジピン投与により網膜全層において発現増加が認められ、特に FGF2 では顕著である。生後5週 of RCS ラット網膜を使用。 GCL: 神経節細胞層, IPL: 内網状層, INL: 内顆粒層, OPL: 外網状層, ONL: 外顆粒層, OS: 視細胞外節 スケールは 50 μm.

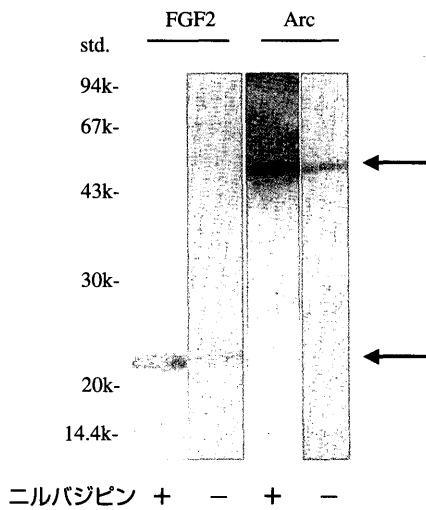


図2 ニルバジピン投与および非投与の RCS ラット網膜での FGF2 および Arc のウエスタンブロット法での解析結果 FGF2 (24kDa), Arc (56kDa) を特異的に認識するバンドがみられ、ニルバジピン投与により両者とも増加している。生後5週 of RCS ラット網膜を使用。

考 按

DNA マイクロアレイ法³⁹⁾は、一度に多数の遺伝子発現を比較解析できることにより生理学的、あるいは薬理的現象の理解に有用な検査法として注目されている。今回、この DNA マイクロアレイ法を用い、網膜変性に対する遅延効果が示唆されているニルバジピン投与により RCS ラット網膜で発現変動する遺伝子について

検討した。1101 個の遺伝子のうち、21 個の遺伝子が有意に発現減少、または増加した。

この中には、種々のホルモンレセプター、ニューロトランスミッターレセプター、ペプチドトランスポーターなどが含まれていたが、これらは Ca²⁺ アンタゴニストとしての作用を受けた影響と考えられ、実際にニルバジピンの作用による遺伝子発現変動をとらえていることを示していると考えられた。また、発現減少した遺伝子の中にはアポトーシスに関連した遺伝子が含まれ、ニルバジピンがアポトーシスの抑制効果を持つことも推察された。これらに加えて、発現増加した遺伝子には、FGF2 および Arc が含まれ注目された。

FGF2 はペプチド性細胞成長因子の一つで、細胞の分裂、増殖、伸長などを促進する物質であり⁴⁰⁾、in vitro および in vivo でのこれまでの研究によって、いわゆる neurosurvival factor としての作用を持つことが知られている⁴¹⁾。網膜変性に関してもよく研究されており、次のような研究結果から、変性過程に抑制的に作用するものと考えられている。1) 変性網膜では、コントロールに比し、有意に FGF2 の発現量が増加している²⁶⁾。2) 外因性の FGF2 は RCS

ラットの網膜変性および光障害による網膜変性に対し神経保護効果を示す²³⁻²⁹⁾。本研究の結果からは、ニルバジピン投与によりRCSラットの変性網膜において内因性のFGF2の発現が増加することが示され、ニルバジピンがRCSラットの網膜変性を遅延させる経路の一つには、FGF2の発現増加による視細胞保護効果が関連していることが示唆された。

Arcは、はじめ、神経におけるimmediate-early genesとして同定された³⁰⁾。Arc mRNAは通常、細胞体内に発現しているが、てんかんなどのさまざまな電氣的シグナルにより軸索からシナプスへと運ばれる。正確な機能は不明な点が多いが、最近になりArcの作用の一つとして神経細胞のアポトーシスに対する抑制的効果が報告された³¹⁾。本研究からニルバジピン投与によりArcの発現が増加することが示され、網膜変性における神経活動に何らかの影響を及ぼしてアポトーシスに抑制的に働いている可能性が示唆された。以上より、本研究により、ニルバジピンがRCSラットの網膜変性を遅延させる機序としてFGF2やArcを介した経路が関与していることが示唆され、これらの知見は今後の網膜変性治療研究への発展的応用が期待される。また一方で、今回の研究に用いた動物の数は比較的少ない数であったため、今回得られた結果をより確かなものにするために今後も引き続きこの研究を継続することも必要であると思われた。

文 献

- 1) Rivolta C, Sharon D, De Angelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002;11:1219-27.
- 2) Travis GH. Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. *Am J Hum Genet* 1998;62:503-8.
- 3) Mullen RJ, LaVail MM. Inherited retinal dystrophy: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental chimeras. *Science* 1976;192:799-801.
- 4) Edwards RB, Szamier RB. Defective phagocytosis of isolated rod outer segment by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science* 1977;197:1001-3.
- 5) Goldman AI, O'Brien PJ. Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat. *Science* 1978;201:1023-5.
- 6) D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MerTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 2000;9:645-51.
- 7) Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla, et al. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 2000;26:270-1.
- 8) Yamazaki H, Ohguro H, Maeda T, Maruyama I, Takano Y, Metoki T, Nakazawa M, et al. Preservation of Retinal morphology and function in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca²⁺ antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:919-26.
- 9) Kuramoto K. Double-blind studies of calcium antagonists in the treatment of hypertension in Japan. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13(Suppl 1):S29-35.
- 10) Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signaling. *Nature* 2001;409:349-54.
- 11) Tata JR. Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem Cell Biol* 1994;72:581-8.
- 12) Sakai I, Kraft AS. The kinase domain of Jak2 mediates induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1997;272:12350-8.
- 13) Guse AH. Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med* 2000;78:26-35.
- 14) Klocke R, Roberds SL, Tamkun MM. Chromosomal mapping in the mouse of eight K(+)-channel genes representing the four shaker-like subfamilies Shaker, Shab, shaw, and Shal. *Genomics* 1993;18:568-74.
- 15) Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwing HG, Huth A, Seelinger MW, Warskulat U, et al. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 2002;16:231-3.

- 16) Chan L. Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1992;267:25621-4.
- 17) Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12048-52.
- 18) Klisovic DD, O'Dorizio MS, Katz SE, et al. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2193-201.
- 19) Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, et al. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 1992;357:336-9.
- 20) Giguere V, Yang N, Segui P. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 1988;331:91-4.
- 21) Goldfarb DA. The renin-angiotensin system. New concepts in regulation of blood pressure and renal function. *Urol Clin North Am* 1994;21:187-94.
- 22) Bonne-Barkay D, Shlissel M, Berman B, Shaoul E, Admon A, Vlodavsky I, Carey DJ, et al. Identification of glypican as a dual modulator of the biological activity of fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 1997;272:12415-21.
- 23) Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 1990;347:83-6.
- 24) Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 1992;12:3554-67.
- 25) LaVail MM, Unoki K, Yasumura D. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:11249-53.
- 26) Perry J, Du J, Kjeldbye H, Gouras P. The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr Eye Res* 1995;14:585-92.
- 27) Gao H, Hollyfield JG. Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. *Exp Eye Res* 1996;62:181-9.
- 28) Fontaine V, Kinkl N, Sahel J. Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 1998;18:9662-72.
- 29) Lau D, McGee LH, Zhou S. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3622-33.
- 30) Steward O, Worley PF. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 2001;30:227-40.
- 31) Irie Y, Yamagata K, Gan Y. Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product arc contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. *J Biol Chem* 2000;275:2647-53.
- 32) Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann G. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 1995;14:433-45.
- 33) Stryer L. The molecules of visual excitation. *Sci Am* 1987;257:42-50.
- 34) Jones DT, Reed RR. Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species. *J Biol Chem* 1987;262:14241-9.
- 35) Chardin P, Tavitian A. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J* 1986;5:2203-8.
- 36) Perney TM, Marshall J, Martin KA. Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J Neurophysiol* 1992;68:756-66.
- 37) Saito H, Terada T, Okuda M. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochem Biophys Acta* 1996;26:173-7.
- 38) Mukai T, Joh K, Arai Y. Tissue-specific expression of rat aldolase A mRNAs. Three molecular species differing only in the 5'-terminal sequences. *J Biol Chem* 1986;261:3347-54.
- 39) DeRisi J, Penland L, Brown PO. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1996;14:457-60.
- 40) Wagner JA. fibroblast growth factors. An emerging family of neuronal growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;165:95-118.

- 41) Abe K, Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacol Res* 2001;43:307-12.