

# ラット眼瞼上皮の糖鎖組織化学的解析

上原 文行, 柳田 豊子, 岩切 直人, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

## 要 約

成熟ラットの眼瞼縁部上皮に分布する複合糖質について、レクチン組織化学と *in situ* hybridization 組織化学とを用いて解析した。基底細胞と表層側の細胞の細胞膜には、*Maackia amurensis* lectin II と jacalin とが結合したため、シアル酸  $\alpha$ 2,3 galactose (Gal)  $\beta$ 1,3 N-acetylgalactosamine (GalNAc) を有する複合糖質が分布し、上皮の中間層の有棘細胞の細胞膜には、peanut agglutinin と jacalin とが結合したことから、Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc を有する複合糖質が分布することが判明した。Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc  $\alpha$ 2,3 シアル酸転移酵素のメッセン

ジャーRNA (mRNA) が基底細胞を除く上皮細胞に検出されたことから、有棘細胞層から表層にかけては、シアル酸含有複合糖質が産生され続け、表層にいくにつれてシアル酸が糖鎖末端に付加されて成熟するものと考えられる。一方、基底細胞の細胞膜に分布する複合糖質は、発生学的に早い時期に合成された後は安定であると推定される。(日眼会誌 101: 385-388, 1997)

キーワード：ラット, 眼瞼, 複合糖質, レクチン, シアル酸転移酵素

## Glycohistochemical Analysis of Rat Eyelid Epithelium

Fumiyuki Uehara, Toyoko Yanagita, Naoto Iwakiri and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

### Abstract

The glycoconjugates in eyelids of adult rats were examined by lectin histochemistry and *in situ* hybridization histochemistry. Since *Maackia amurensis* lectin II and jacalin bound to the cell membranes of basal and apical epithelial cells, sialic acid  $\alpha$ 2,3 galactose (Gal)  $\beta$ 1,3 N-acetylgalactosamine (GalNAc) sequence is present in the glycoconjugates of their cell membranes. Peanut agglutinin bound to the cell membranes of spinous cells in the middle of the epithelium, suggesting that Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc sequence is present in their glycoconjugates. The mRNA of Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc  $\alpha$ 2,3-

sialyltransferase was detected in the cytoplasm of the epithelial cells other than the basal cells. This observation suggests that sialoglycoconjugates may be newly synthesized in the spinous and apical cells, while the glycoconjugates in the cell membranes of basal cells may be produced at an early stage of development and are stable without turnover. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 385-388, 1997)

Key words: Rat, Eyelid, Glycoconjugates, Lectin, Sialyltransferase

## I 緒 言

著者らは先に、ヒト眼瞼腫瘍の糖鎖組織化学的検索を行い、O-結合型複合糖質の一つであるムチン関連糖鎖抗原が腫瘍細胞の浸潤・転移などの悪性形質の発現に関与している可能性が高いことを報告した(第100回日本眼科学会総会)。今後、眼瞼腫瘍の糖鎖生物学的な病態研究を進めて行く上で、実験動物を用いた研究は種々の有用

な基礎的情報をもたらしてくれるものと期待される。そこで、ラットの眼瞼上皮に分布するO-結合型複合糖質の糖鎖構造について、レクチン組織化学およびシアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学の糖鎖組織化学的手法を用いて解析した。

## II 方 法

成熟白色 Wistar ラット(10週齢)を5匹、炭酸ガスを

別刷請求先：890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行  
(平成8年10月17日受付, 平成8年12月27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-shi, Kagoshima-ken 890, Japan

(Received October 17, 1996 and accepted in revised form December 27, 1996)

吸引させて安楽死させた後、ただちに0.5% グルタルアルデヒド、4% パラホルムアルデヒド/燐酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を用いて6分間灌流固定した。次に、眼瞼を切除し、同固定液を用いて一晚浸漬固定、アルコール脱水の後、パラフィン包埋して8 $\mu$ mの組織切片を作成した。

### 1. レクチン組織化学

組織切片を脱パラフィンし、0.2% 過酸化水素/メタノールを5分間浸漬させて内因性ペルオキシダーゼ活性を、2% ウシ血清アルブミンを30分間浸漬させてレクチンの非特異的吸着をそれぞれ抑制した。次に、組織切片にVector Laboratories社(Burlingame, CA, 米国)製のビオチン標識 *Maackia amurensis* lectin II (MAL II; 10  $\mu$ g/ml PBS)、ビオチン標識 peanut agglutinin (PNA; 10  $\mu$ g/ml PBS)、ビオチン標識 jacalin (10  $\mu$ g/ml PBS) のいずれかを室温で1時間ずつ反応させた。対照としては、それぞれのハプテン糖 (MAL II: 0.1 M 3'-sialyl-lactose; PNA と jacalin: 0.2 M D-galactose) を含むレクチン溶解液を同様に反応させた。Vectastain Elite ABC キット (Vector Laboratories 社) と diaminobenzidine を用いて発色させ、眼瞼の瞼縁部上皮のそれぞれのレクチン結合分布について光学顕微鏡的に観察した。

### 2. シアル酸転移酵素メッセンジャーRNA (mRNA) の *in situ* hybridization の組織化学

基本的には先に報告した方法<sup>1)</sup>に従った。その概略を述べる。組織切片を脱パラフィンし、proteinase K (20  $\mu$ g/ml PBS) を用いて、37°C, 60分間消化することによって mRNA 周囲の蛋白質を除去した。次に、先に報告した方法<sup>2)</sup>で調整した、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc  $\alpha$ 2,3 シアル酸転移酵素 ( $\alpha$ 2,3 シアル酸転移酵素) mRNA<sup>3)</sup> に対するアンチセンスのコンプリメンタリーRNA (cRNA) プロープとセンスの cRNA プロープとをそれぞれ 45°C で一昼夜ハイブリダイズさせた。50% フォルムアミドを用いて 45°C, 1時間洗浄した後、RNAase (20  $\mu$ g/ml 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) を用いて 37°C, 30分間消化して、非特異的に吸着したプロープを分解させた。次に、1% ブロッキング緩衝液 (Boehringer Mannheim) に 2% ヒツジ血清を混合した液を室温で30分間浸漬させた後、アルカリホスファターゼ (AP) 標識抗 digoxigenin 抗体 (Boehringer Mannheim; 4  $\mu$ l/ml 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) を室温で2時間反応させた。AP 発色液を用いて発色させ、プロープのハイブリダイズした部位について、光学顕微鏡的に観察した。

## III 結 果

### 1. レクチン組織化学

MAL II は、瞼縁部上皮の基底細胞の細胞膜に強く、上皮の中間層を構成する有棘細胞の細胞質に弱く、上皮の表層側の細胞の細胞膜に強く結合した (図1A)。PNA

は、基底細胞には全く結合せず、上皮の中間層を構成する有棘細胞の細胞膜に強く結合したが、上皮の表層側の細胞には微弱にしか結合しなかった (図1B)。Jacalin は、基底細胞、有棘細胞および上皮の表層側の細胞のすべての細胞膜に強く結合した (図1C)。ハプテン糖を含むレクチン溶解液を反応させた組織切片では、いずれのレクチンでも発色が著しく減弱した (図1D: 0.2 M D-galactose を混合したビオチン標識 PNA 染色)。よって、それぞれのレクチンが特異的に糖鎖を認識して結合したものと判断した。

### 2. シアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学

$\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素 mRNA に対するアンチセンスの cRNA プロープは、瞼縁部上皮の基底細胞を除く細胞の細胞質に、びまん性にハイブリダイズしている発色像が観察された (図2A)。一方、センスの cRNA プロープをハイブリダイズさせた組織切片には、ほとんど微弱な発色像しか観察されなかった (図2B)。したがって、アンチセンスの cRNA プロープは、特異的に  $\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素 mRNA の塩基配列を認識してハイブリダイズしたものと判断した。

## IV 考 按

本研究で使用したそれぞれのレクチンが認識する糖鎖構造は、MAL II がシアル酸  $\alpha$  2,3 galactose (Gal)<sup>4)</sup>、PNA が Gal  $\beta$  1,3 N-acetylgalactosamine (GalNAc)<sup>5)</sup>、jacalin がシアル酸 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc である<sup>6)</sup>ことから、ラット眼瞼縁の上皮を構成する細胞に分布する複合糖質の糖質構造は、次のように特定される。まず、基底細胞の細胞膜には MAL II と jacalin が結合したのに対し、PNA は結合しなかったことから、シアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc を糖鎖末端構造として有する複合糖質が分布しているものと考えられる。次に、上皮の中間層を構成する有棘細胞の細胞膜には PNA と jacalin が結合したのに対し、MAL II は細胞質に弱く結合した状態にとどまったことから、この領域の細胞膜に分布する複合糖質は未だ未熟で、糖鎖末端の Gal  $\beta$  1,3 GalNAc が露出した状態にあるものと考えられる。上皮の表層を構成する細胞の細胞膜には jacalin は結合し続けたのに対し、PNA の結合は減弱し、MAL II の結合が増強したことから、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc にシアル酸が  $\alpha$  2,3 結合した、いわゆる成熟した糖鎖を有する複合糖質が分布しているものと考えられる。

一方、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc にシアル酸を  $\alpha$  2,3 結合させるシアル酸転移酵素の mRNA の発現像は、基底細胞の細胞質には検出されなかったことから、基底細胞の細胞膜に分布し、MAL II によって検出される複合糖質は発生的にもっと早い時期に合成され、いったん、基底細胞周囲に分布した後は安定で、新しく合成されないものと

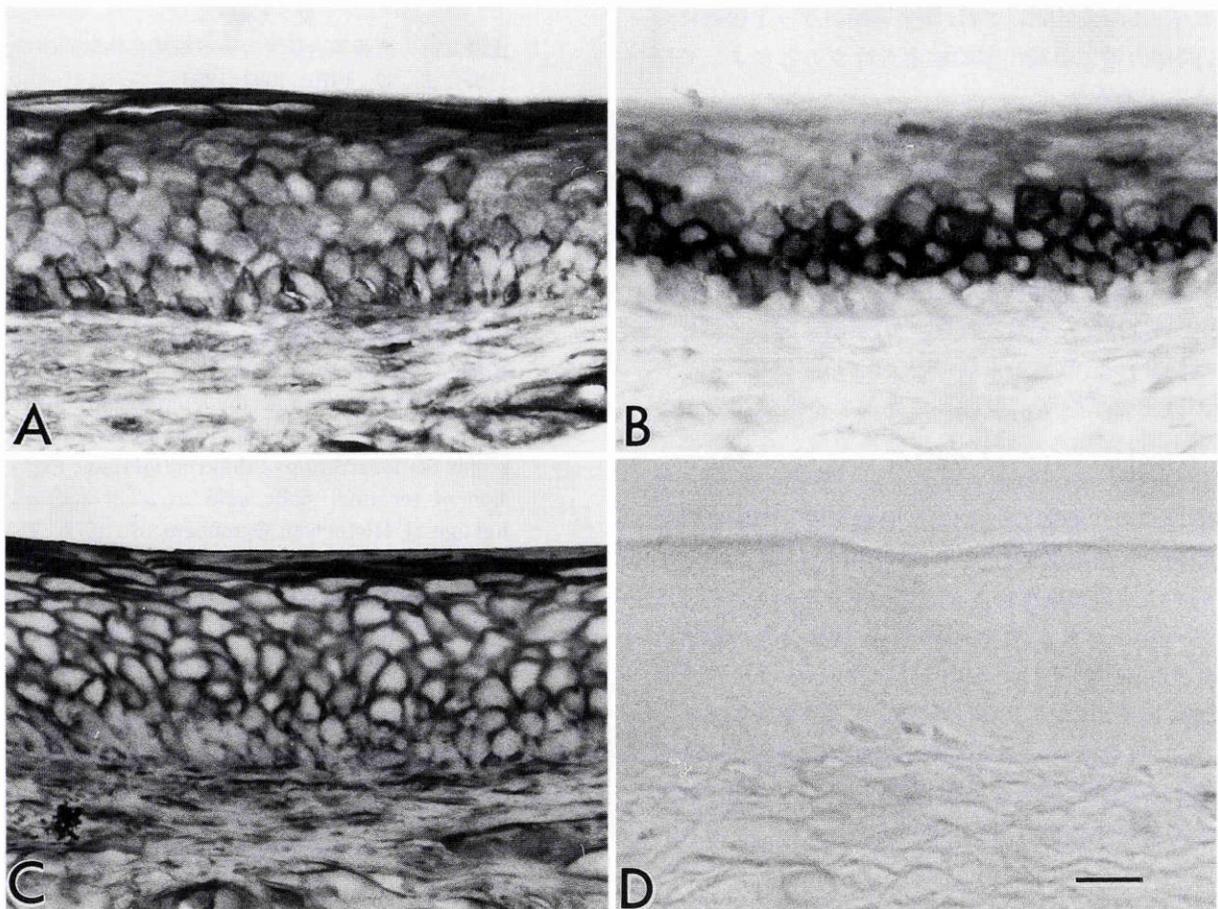


図1 ラット眼瞼縁部上皮のビオチン標識レクチン染色像。

A: *Maackia amurensis* lectin II 染色, B: Peanut agglutinin (PNA) 染色, C: Jacalin 染色, D: 0.2 M D-galactose を混合した PNA 染色. バーは 20  $\mu$ m

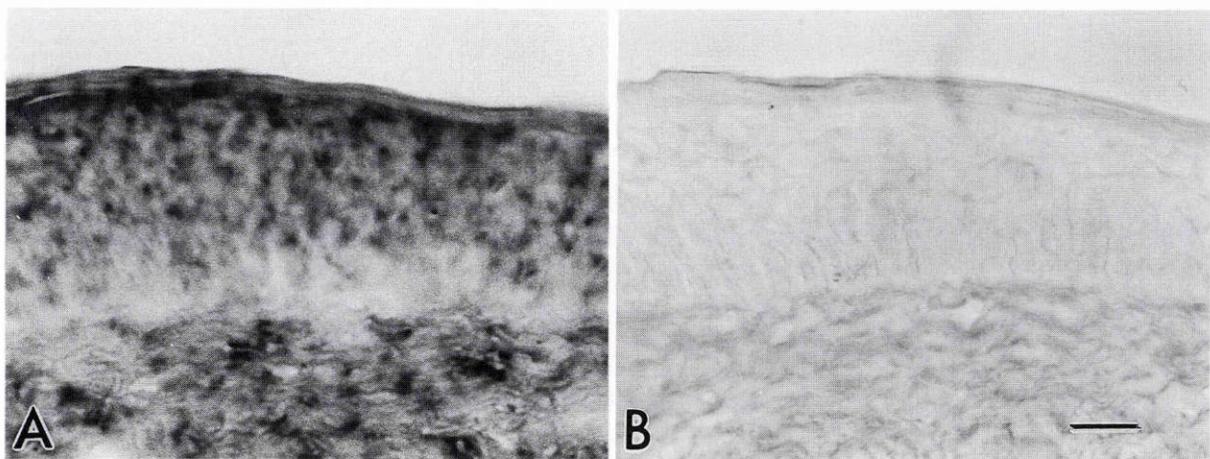


図2 ラット眼瞼縁部上皮の cRNA probe を用いた *in situ* hybridization 組織染色像。

A:  $\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素 mRNA に対する antisense probe のハイブリダイズ像, B:  $\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素メッセンジャー-RNA (mRNA) に対する sense probe のハイブリダイズ像. バーは 20  $\mu$ m

推定される。この複合糖質の turnover されにくい性質は、基底細胞を基底膜の上に安定した状態に保持する上で、非常に都合がよいものと考えられる。それに対し、有棘細胞の細胞質にはシアル酸転移酵素の mRNA の発現像が検出されたことから、絶えず O-結合型の複合糖鎖が

合成され続けているものと推定される。その合成の過程が、上皮の中間層ではまだシアル酸が結合しきっていない未熟な段階として細胞質内に、上皮の表層側ではシアル酸が結合し終わった成熟した段階として細胞膜に、それぞれ MAL II によってとらえられたのであろうと考

えられる。この点に関しては、発生早期のラット眼瞼について、同様の糖鎖組織化学的検索を行うことによって証明できるであろう。

本研究によって、ラット眼瞼縁部上皮に同定されたO-結合型の複合糖質は、基底細胞の細胞膜に分布しているものと、有棘細胞の細胞膜に分布しているものとは、その動態が異なっていることから、別々の複合糖質である可能性が高い。眼瞼の複合糖質について解析した報告は、過去にはほとんどみられないが、皮膚に関してはいくつか散見される。皮膚の重層扁平上皮の基底細胞、あるいはその直上の細胞層に局限して発現する糖蛋白として desmocollin が知られており、皮膚科領域の疾患と関連した研究が精力的に進められている<sup>7)</sup>。著者らが今回、糖鎖組織化学的に検索した部位は、眼瞼皮膚と眼瞼結膜の間に位置する瞼縁部であり、その解剖学的特殊性から、ここに分布する複合糖質は皮膚に分布するものとは異なっている可能性がある。これらのO-結合型の複合糖質と desmocollin が共通したものかどうかという点を含めて、今後、電子顕微鏡レベルで正確な局在部位を特定するとともに、レクチンアフィニティクロマトグラフィを用いてこれらの複合糖質を分離し、蛋白部分の生化学的解析を進めていく必要があるであろう。

本研究は、文部省科学研究費(基盤C, 07671928)の補助によって行った。

## 文 献

- 1) 上原文行：網膜複合糖質の分子細胞生物学的研究。日眼会誌 97: 1370—1393, 1993.
- 2) Uehara F, Ozawa M, Iwakiri N, Ohba N: Expression of distribution of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase mRNA in rat cornea. Jpn J Ophthalmol 39: 30—34, 1995.
- 3) Gillespie W, Kelm S, Paulson JC: Cloning and expression of the Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc $\alpha$ 2,3-sialyltransferase. J Biol Chem 267: 21004—21010, 1992.
- 4) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu5Ac ( $\alpha$ 2,3)Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc sequence with the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*: Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-linkage. J Histochem Cytochem 37: 1577—1588, 1989.
- 5) 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.
- 6) Hortin GL, Trimpe BL: Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of jacalin-agarose. Analytical Biochem 188: 271—277, 1990.
- 7) King IA, Sullivan KH, Bennett R Jr, Buxton RS: The desmocollins of human foreskin epidermis: Identification and chromosomal assignment of a third gene and expression patterns of the three isoforms. J Invest Dermatol 105: 314—321, 1995.