

# 生後早期のラット眼瞼上皮のレクチン組織化学的解析

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

生後0～1日目のラットの眼瞼上皮の複合糖質について、レクチン組織化学的に検索した。シアル酸 $\alpha$ 2,3 galactose  $\beta$ 1,3 N-acetylgalactosamine (Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc),あるいはシアル酸 $\alpha$ 2,3 galactose  $\beta$ 1,4 N-acetylglucosamine を認識する *Maackia amurensis* lectin II が基底細胞の細胞膜に結合したことから、生下時に既に基底細胞の細胞膜には、これらの糖鎖を有する複合糖質が分布していることが明らかになった。Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc を認識するレクチンのうち、糖鎖末

端に存在するシアル酸の影響を受けない jacalin は、基底細胞の細胞膜に結合したのに対し、シアル酸の存在によってその結合が阻害される peanut agglutinin の結合像は観察されなかったことから、基底細胞の細胞膜に分布する複合糖質の糖鎖の Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc は、すべてシアル酸が結合した成熟した形で存在しているものと考えられた。(日眼会誌 101: 571-574, 1997)

キーワード：ラット, 眼瞼, 複合糖質, レクチン

## Lectin-histochemical Study of Early Postnatal Eyelid Epithelium of the Rat

Fumiyuki Uehara, Toyoko Yanagita, Naoto Iwakiri and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

### Abstract

The glycoconjugates in neonate rat eyelids at postnatal day 0 or 1 were examined by lectin histochemistry. *Maackia amurensis* lectin II, which recognizes sialic acid  $\alpha$ 2,3 galactose  $\beta$ 1,3 N-acetylgalactosamine (Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc) or sialic acid  $\alpha$ 2,3 galactose  $\beta$ 1,4 N-acetylglucosamine, bound to the cell membranes of the epithelial basal cells, suggesting that the glycoconjugates containing these sugar chains are present on their cell membranes. With respect to the binding of the Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc-specific lectin, jacalin, whose binding is not inhibited

by the terminal sialic acid, bound to the cell membranes of the epithelial basal cells, whereas peanut agglutinin, whose binding is inhibited by the terminal sialyl residue, did not bind to their cell membranes. These findings suggest that all the residues of Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc in the glycoconjugates of their cell membranes are sialylated as the mature form. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 571-574, 1997)

Key words: Rat, Eyelid, Glycoconjugate, Lectin

## I 緒 言

細胞表面の複合糖質は、細胞接着、細胞間物質輸送、細胞増殖の促進・抑制、貪食などの細胞間あるいは細胞-細胞外基質間の相互作用に際し、重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。著者らは、眼瞼腫瘍の増殖、浸潤、転移の仕組みを解明するための基礎的資料を得る目的で、正常眼瞼上皮の複合糖質に関する糖鎖組織化学的研究を進めており、最近、成熟ラット眼瞼縁部上皮の細胞膜に分布するO-結合型のシアル酸含有複合糖質の動態が、基底細胞と表層

側の上皮細胞とで異なっている可能性があることを報告<sup>2)</sup>した。すなわち、基底細胞の細胞膜に分布するシアル酸含有複合糖質は、発生学的に早い時期にいったん合成された後は安定で、代謝されにくいのに対し、表層側の上皮細胞の細胞膜に分布する複合糖質は成熟眼瞼上皮でも産生され続け、表層に向かって移動するにつれて、シアル酸が糖鎖末端に付加されて成熟するものと推定した<sup>2)</sup>。この仮説をより強固なものにするためには、実際に生後早期のラット眼瞼縁部上皮の基底細胞の細胞膜に、既にシアル酸含有複合糖質が分布していることを証明する必要が

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2月18日受付,平成9年3月2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 February 18, 1996 and accepted in revised form March 2, 1997)



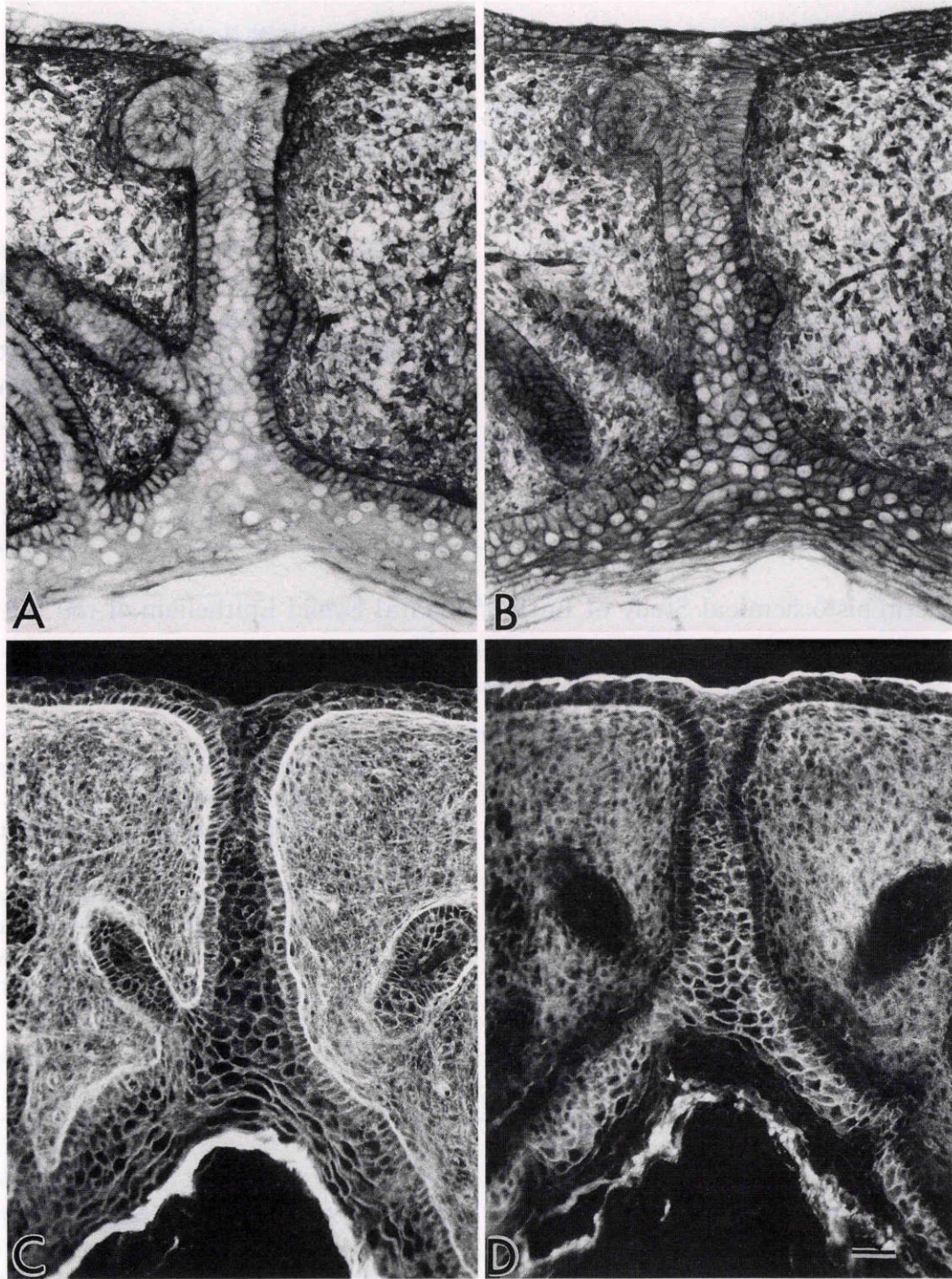


図1 生後0～1日目のラット眼瞼上皮のレクチン染色像。

A: ビオチン標識 *Maackia amurensis* lectin II 染色像, B: ビオチン標識 jacalin 染色像, C: 蛍光標識 wheat germ agglutinin 染色像, D: 蛍光標識 peanut agglutinin 染色像。バーは 40  $\mu\text{m}$

ある。そこで本研究においては、生後早期のラット眼瞼上皮の複合糖質について、レクチン組織化学的手法を用いて検索してみた。

## II 方 法

妊娠した白色 Wistar ラットを通常の光環境下(12時間明/12時間暗)に飼育し、出産させた。生後0～1日目のラット(出産中のラット内のケージから得た)を4匹、

炭酸ガスを吸引させて安楽死させ、眼窩内容除去を行い、眼瞼と眼球を一塊として10%ホルマリン液を用いて浸漬固定した。摘出組織をアルコール脱水、パラフィン包埋した後、5  $\mu\text{m}$ の厚さの光学顕微鏡用の組織切片を作製した。切片を脱パラフィン後、0.2%過酸化水素/メタノールに10分間浸漬して、内因性ペルオキシダーゼ活性を燐酸緩衝液(PBS)に溶解した2%ウシ血清アルブミンに30分間浸漬して、レクチンの非特異的吸着をそれぞ



れ抑制した。次に、 $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度になるように2% ウシ血清アルブミン/PBS に溶解したビオチン標識 *Maackia amurensis* lectin II (MAL II), ビオチン標識 jacalin, 蛍光標識 wheat germ agglutinin (WGA) および 蛍光標識 peanut agglutinin (PNA) を、組織切片にそれぞれ室温で1時間ずつ反応させた(いずれのレクチンも Vector 社, USA から購入)。対照実験としては、それぞれのレクチンのハプテン糖 (MAL II : 3'-sialyllactose ; jacalin と PNA : D-galactose ; WGA : N, N', N''-chitotriose) を  $0.1 \text{ M}$  の濃度になるように混合したレクチンの溶液を反応させた。PBS を用いて洗浄した後、ビオチン標識したレクチンを反応させた組織切片は、さらに、Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社, USA) とジアミノベンチジンをを用いてペルオキシダーゼ発色させた。生後早期のラット眼瞼瞼縁部上皮のレクチン結合分布について、ビオチン標識レクチンを反応させた組織切片は光学顕微鏡を、蛍光標識レクチンを反応させた組織切片は蛍光顕微鏡をそれぞれ用いて観察した。

### III 結 果

本研究報告では、上下眼瞼が癒合している部位だけでなく、近傍の皮膚側(図1下方)と、結膜側(図1上方)の上皮をひっくるめて瞼縁部と総称した。ビオチン標識 MAL II は、生後0~1日目のラットの瞼縁部上皮全体にわたって基底細胞の細胞膜に結合したが、特に基底膜に面している部分に強い結合像が観察された(図1A)。

一方、外界に面している皮膚側上皮には、最表層に線状に、表層の上皮細胞の細胞膜に散在性に軽度の MAL II の染色像が観察された(図1A 下方)。ビオチン標識 jacalin は瞼縁部の全領域にわたって、基底細胞から表層側のすべての上皮細胞の細胞膜に結合した(図1B)。蛍光標識 WGA も、瞼縁部の全領域にわたって、基底細胞から表層側のすべての上皮細胞の細胞膜に結合した(図1C)。さらに、外界に面している皮膚側最表層に帯状に強い染色像が観察された(図1C 下方)。蛍光標識 PNA は、基底細胞を除く上皮細胞の細胞膜に、上下眼瞼の境界部から結膜側にかけてはほぼ全体的に(図1D 真ん中から上方)、皮膚側面においては表層の数層を除いて結合した(図1D 下方)。一方、結膜面と皮膚面の最表層に帯状の染色像が観察された(図1D 上下)。これらのレクチン結合の強さは、それぞれのハプテン糖の存在下に減弱した(図2A, B)ことから、各レクチンがそれぞれに特異的な糖鎖を認識して結合したものとみなした。

### IV 考 按

本研究において、シアル酸  $\alpha 2,3$  galactose  $\beta 1,3$  N-acetylgalactosamine (Gal  $\beta 1,3$  GalNAc), あるいはシアル酸  $\alpha 2,3$  galactose  $\beta 1,4$  N-acetylglucosamine (Gal  $\beta 1,4$  GlcNAc) を認識する MAL II<sup>3)</sup> は、生後0~1日目のラットの瞼縁部上皮の基底細胞の細胞膜に結合したことから、生下時に既に基底細胞の細胞膜には、これらの糖鎖を有する複合糖質が分布していることが明らか

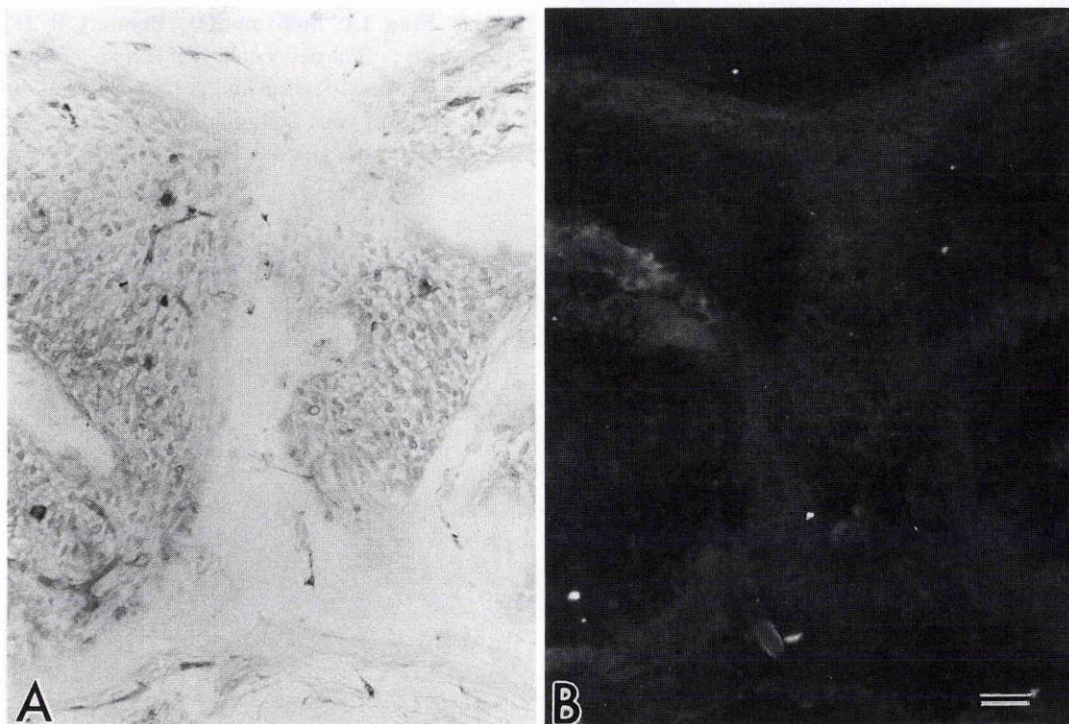


図2 生後0~1日目のラット眼瞼上皮のレクチン染色像(対照)。

A : ビオチン標識 jacalin と D-galactose の混合液を用いた染色像, B : 蛍光標識 peanut agglutinin と D-galactose の混合液を用いた染色像。バーは  $40 \mu\text{m}$



かになった。Gal  $\beta$  1,3 GalNAc を認識する jacalin と PNA の基底細胞の細胞膜への結合性に関しては、糖鎖末端に存在するシアル酸の影響を受けない jacalin<sup>4)</sup> は結合したのに対し、シアル酸の存在によって阻害される PNA<sup>5)</sup> は結合しなかったことから、基底細胞の細胞膜に分布する複合糖質の糖鎖の Gal  $\beta$  1,3 GalNAc は、すべてシアル酸が結合した成熟した形で存在しているものと考えられる。眼縁部の表層側の上皮細胞の細胞膜には、MAL II の結合像は観察されなかったが、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc を認識する PNA は結合したことから、糖鎖末端にシアル酸が結合していない Gal  $\beta$  1,3 GalNAc は分布していることが明らかになった。シアル酸が糖鎖末端に存在していても Gal  $\beta$  1,3 GalNAc に結合し得る jacalin が、基底細胞から表層側のすべての上皮細胞の細胞膜に結合したことは、これらの糖鎖の分布の所見と一致していると考えられる。皮膚側面においては、表層の数層に PNA が結合しなかった代わりに、散在性に MAL II が結合した、これらの部位では既に糖鎖末端へのシアル酸の付加が開始されているのであろう。一方、シアル酸あるいは GlcNAc に特異的な WGA<sup>6)</sup> も基底細胞だけでなく、表層側の上皮細胞の細胞膜にも結合したことから、GalNAc を含む糖鎖だけでなく、GlcNAc を含む糖鎖もこれらの細胞膜に存在することが示唆される。

以上本研究によって、ラットにおいては、生下時に既に眼瞼上皮の基底細胞の細胞膜にシアル酸を含有する複合糖質が分布していることが明らかになった。著者らは、生後の眼瞼上皮の基底細胞では、シアル酸含有複合糖質の合成を行わないことを *in situ* hybridization 組織化学的に確認しており<sup>2)</sup>、基底細胞膜に分布するシアル酸含有複合糖質は生前に合成された後は安定で、基底細胞を基底膜上に保持するための役割を果たしている可能性が高いものと考えられる。今後、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発現することが報告さ

れている desmocollin<sup>7)</sup> などの関連性について明らかにするために、本研究でレクチン組織化学的に同定したシアル酸含有複合糖質の生化学的解析を進めていく必要がある。

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) 上原文行, 柳田豊子, 岩切直人, 大庭紀雄：ラット眼瞼上皮の糖鎖組織化学的解析。日眼会誌 101：385—388, 1997.
- 3) 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 leucoagglutinin 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.
- 4) Hortin GL, Trimpe BL: Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of jacalin-agarose. Anal Biochem 188: 271—277, 1990.
- 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) Nagata Y, Burger MM: Wheat germ agglutinin: Molecular characteristics and specificity for sugar binding. J Biol Chem 249: 3116—3122, 1974.
- 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.