

ラット角膜・結膜上皮における細胞質シアリダーゼの免疫組織化学的局在

上原 文行¹⁾, 大庭 紀雄¹⁾, 宮城 妙子²⁾

¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾宮城県立がんセンター研究所

要 約

ラット角膜・結膜上皮におけるシアル酸含有糖鎖形成の動態の一端を明らかにする目的で, 細胞質シアリダーゼの分布を免疫組織化学的に検索するとともに, その分布に対応するようにシアル酸含有糖鎖が分布しているかどうか確認するため, *Maackia amurensis* lectin II (MAL II: シアル酸 α 2,3 ガラクトースに特異的)の結合部位をレクチン組織化学的に検索した。細胞質シアリダーゼは角膜・結膜上皮の中間層から基底層の上皮細胞の細胞質に検出されたのに対し, MAL II は角膜・結膜

上皮の表層と杯細胞の粘液顆粒に結合した。角膜・結膜上皮の中間層から基底層では, 細胞質シアリダーゼの作用によって複合糖質糖鎖末端にシアル酸が付加されないため, MAL II が結合しないものと考えられた。これらの部位において, 細胞質シアリダーゼは眼表面上皮に感染して侵入してくる微生物に対し, 防御的に働いている可能性がある。(日眼会誌 101: 707-710, 1997)

キーワード: ラット, 角膜, 結膜, シアリダーゼ, 複合糖質

Immunohistochemical Localization of Cytosolic Sialidase in the Epithelium of Rat Cornea and Conjunctiva

Fumiyuki Uehara¹⁾, Norio Ohba¹⁾ and Taeko Miyagi²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

²⁾Research Institute, Miyagi Cancer Center

Abstract

The binding sites of the anti-cytosolic sialidase antibody and *Maackia amurensis* lectin II (MAL II: specific for sialic acid α 2, 3 galactose) in the epithelium of the rat cornea and conjunctiva were immunohistochemically and lectin-histochemically examined, respectively. Cytosolic sialidase was detected in the cytoplasm of the middle and basal epithelium of the cornea and conjunctiva, whereas MAL II bound to the apical region of their epithelium and the mucous of the goblet cells. The predom-

inant action of the cytosolic sialidase, which is stronger than that of the sialyltransferase, may inhibit the terminal sialylation of the glycoconjugates at the middle and basal regions of the epithelium of the cornea and conjunctiva. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 707-710, 1997)

Key words: Rat, Cornea, Conjunctiva, Sialidase, Glycoconjugate

I 緒 言

細胞表面の複合糖質は, 細胞の増殖・分化・接着, 食細胞によるアポトーシス小体の貪食, 癌細胞の免疫監視機構からの逃避・浸潤・転移, 微生物の粘膜への感染などの細胞間, あるいは細胞-細胞外基質間の様々な相互作用に際し, 重要な役割を果たしている¹⁾. 複合糖質の糖鎖は

糖転移酵素群の作用によって形成されるが, 糖鎖末端においてはシアリダーゼとシアル酸転移酵素とがバランスを保ちながらシアル酸残基の付加反応を調節している²⁾. 著者らは先に, 細胞質シアリダーゼの網膜における分布について免疫組織化学的に検索し, 視細胞層においては杆体内節に特異的に分布していることを報告³⁾した。この細胞質シアリダーゼは, 杆体周囲に特異的に分布

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9年3月21日受付, 平成9年4月30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 March 21, 1997 and accepted in revised form April 30, 1997)

する複合糖質の糖鎖末端のシアル酸含有糖鎖形成を調節しているものと推定され、この作用がシアル酸転移酵素よりも優位になって、糖鎖末端のシアル酸が減少することは杆体視細胞の変性につながる可能性がある。また、赤血球膜の表面の複合糖質の糖鎖末端のシアル酸が減少すると、網内系細胞によって貪食・除去されることなどが古くから知られている⁴⁾。このように、細胞間相互作用において糖鎖末端に位置するシアル酸の動態が特に重要な役割を果たしていると考えられることから、その減少に関与していると考えられるシアリダーゼの役割、あるいは組織における分布に関し、著者らは大きな関心を抱いている。動物のシアリダーゼには、少なくとも4種類のものであることが知られており、細胞質シアリダーゼは中性pH付近でオリゴ糖や糖タンパク質、ガングリオシドなどに作用する⁵⁾。

ところで、角膜・結膜上皮にもシアル酸含有複合糖質が分布している⁶⁾。したがって、角膜・結膜上皮においても杆体視細胞と同様に、細胞質シアリダーゼが分布しているシアル酸含有糖鎖形成の調節に関与している可能性がある。その局在部位を同定することによって、角膜・結膜上皮におけるシアル酸含有糖鎖形成の動態の一端を明らかにし得るものと期待される。そこで本研究においては、ラットの角膜・結膜上皮の細胞質シアリダーゼ分布について、免疫組織化学的手法を用いて検索するとともに、その分布に対応するようにシアル酸含有糖鎖が分布しているかどうかを確認するために、シアル酸に特異的なレクチンである *Maackia amurensis* lectin II⁷⁾ (MAL II) を用いて組織化学的に検索した。

II 方 法

4匹の成熟白色 Wistar ラット(8週齢の雄)を通常の光環境下(12時間明/12時間暗)に飼育し、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 μ 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抑制し、燐酸緩衝液(PBS, 0.01 M, pH 7.4)に溶解した3%山羊血清あるいは2%ウシ血清アルブミンに30分間浸漬して抗体あるいはレクチンの非特異的吸着をそれぞれ抑制した。

1. 免疫組織化学の方法

細胞質シアリダーゼに対する家兎ポリクローナル抗体(宮城が先に報告した方法²⁾で作製した抗体:3%山羊血清/PBSに100倍希釈溶解)を組織切片に室温で1時間反応させた。陰性対照としては、非免疫正常家兎血清(PBSに100倍希釈溶解)を反応させた。PBSを用いて洗浄した後、二次抗体としてビオチン標識した抗家兎

IgG(Vector Laboratories社, Burlingame, CA, 米国:3%山羊血清/PBSに100倍希釈溶解)を室温で1時間反応させた。PBSを用いて洗浄した後、ビオチン・アピチンシステムに則ってVectastain Elite ABC Kit(Vector Laboratories社)を用いて、組織に結合した二次抗体のビオチンにアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体を結合させ、さらにペルオキシダーゼ部分をジアミノベンチジンを用いて発色させた。

2. レクチン組織化学の方法

10 μ 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MAL II(シアル酸 α 2,3ガラクトースに特異的⁷⁾, Vector Laboratories社)を組織切片に室温で1時間反応させた。陰性対照としては、ハプテン糖(3'-sialyllactose)を0.1 Mの濃度になるように混合したMAL IIの溶液を反応させた。PBSを用いて洗浄した後、上記のビオチン・アピチンシステムに則ってペルオキシダーゼ発色させた。

III 結 果

抗細胞質シアリダーゼ抗体は、角膜中央部から輪部にかけて、いずれの部位でも角膜上皮の翼状細胞層から基底細胞層にかけては上皮細胞の細胞質に強い反応像が観察された(図1A)。陰性対照の組織切片では、角膜上皮の全層にわたって微弱な発色像しか観察されなかった(図1B)。一方、結膜上皮においては、中間層から基底層の細胞質と杯細胞の基底部に強く、抗細胞質シアリダーゼ抗体の反応像が観察された(図1C)。結膜上皮の表層にも微弱から軽度の抗体の反応像が観察されたが、陰性対照の組織切片(図1D)にも同様の発色像が観察されたことから、抗細胞質シアリダーゼ抗体は、結膜上皮に関しては中間層から基底層だけに特異的に反応したものとみなした。

MAL IIは、角膜中央部から輪部にかけて、いずれの部位でも角膜上皮の表層細胞層に強い発色像が得られたが、翼状細胞層から基底細胞層にかけては弱い発色像しか得られなかった(図2A)。陰性対照の組織切片では、角膜上皮のどの部分にもほとんどMAL IIの発色像は観察されなかった(図2B)。一方、結膜上皮においては、MAL IIは瞼結膜、円蓋部結膜、および球結膜の上皮の表層と杯細胞の粘液顆粒に強い発色像が得られたが、結膜上皮の中間層から基底層には弱い発色像しか得られなかった(図2C)。陰性対照の組織切片では、ほとんどMAL IIの発色像は観察されなかった(図2D)。

IV 考 按

細胞質シアリダーゼは、複合糖質の糖鎖を形成するに当たり、シアル酸転移酵素の作用に対して拮抗的に働き、糖鎖末端にシアル酸が付加されるのを抑制する方向に働くものと一緒に考えられている²⁾。本研究のレクチン組

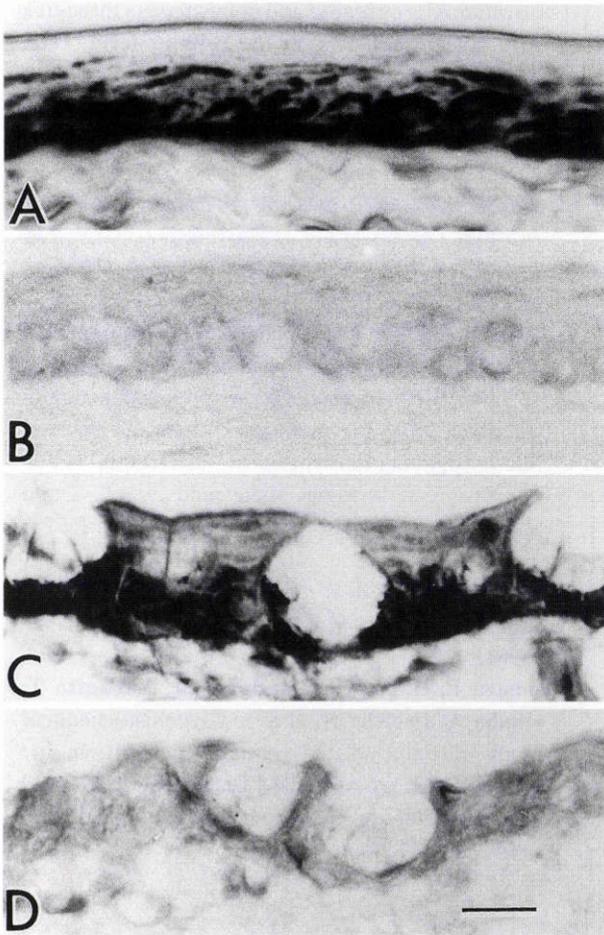


図1 ラット角膜・結膜上皮の抗細胞質シアリダーゼ抗体反応像。
A: 角膜上皮の抗細胞質シアリダーゼ抗体反応像,
B: A の陰性対照, C: 結膜上皮の抗細胞質シアリダーゼ抗体反応像, D: C の陰性対照. バーは 20 μm

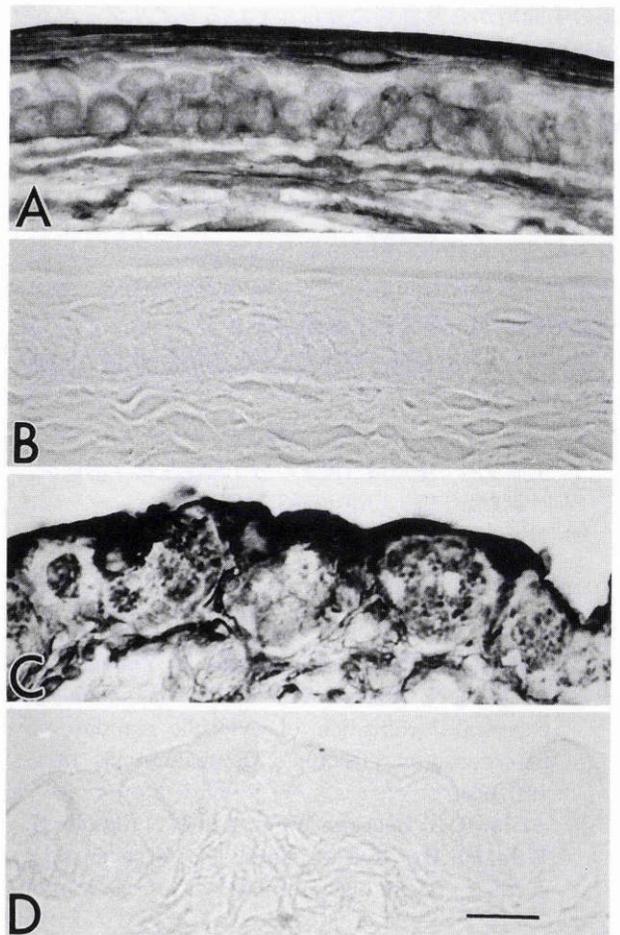


図2 ラット角膜・結膜上皮の *Maackia amurensis* lectin II (MAL II) 染色像。
A: 角膜上皮の MAL II 染色像, B: A の陰性対照, C: 結膜上皮の MAL II 染色像, D: C の陰性対照. バーは 20 μm

織染色で、シアル酸 $\alpha 2,3$ ガラクトースを認識する MAL II⁹⁾ が角膜・結膜上皮細胞の表層と結膜杯細胞の粘液顆粒に強く結合したことから、これらの部位では糖鎖末端にシアル酸が付加される反応が優勢であると考えられる。確かに本研究の免疫組織染色で、これらの部位には細胞質シアリダーゼがほとんど検出されなかったことから、シアル酸転移酵素の作用が抑制されることなく、糖鎖末端にシアル酸が付加されたものと推定される。一方、本研究のレクチン組織染色で、角膜・結膜上皮の中間層から基底層の MAL II 染色が弱かったことから、これらの部位ではシアル酸の付加反応が起こりにくい状況にあると考えられる。本研究の免疫組織染色で、これらの部位に細胞質シアリダーゼが検出されたことから、角膜・結膜上皮の中間層から基底層では、ただ単に分化の過程で糖鎖形成が未熟というだけでなく、積極的に糖鎖末端へのシアル酸付加の抑制反応が起こっているものと推定される。

一方、細胞質シアリダーゼが角膜・結膜上皮の表層まで異常分布した場合には、眼表面上皮の複合糖質の糖鎖

末端のシアル酸が欠如してしまい、涙液保持障害などが起こる可能性が考えられる。これらの病態と細胞質シアリダーゼ分布との関係について、今後の研究で明らかにしていく必要があるであろう。

以上のように、角膜・結膜上皮における細胞質シアリダーゼが分布する部位には、シアル酸に特異的なレクチンの発色像が得られないという矛盾しない結果が得られたが、角膜・結膜上皮の中間層から基底層では、なぜシアル酸付加の抑制反応が起こっているのであろうか、あるいはなぜ細胞質シアリダーゼが分布しているのであろうか。角膜・結膜上皮は、いわゆる ocular surface として外界に接していることから、微生物に対する防御機構を備えていなければならない。角膜・結膜上皮表層に分布しているシアル酸含有複合糖質が涙液層とともに、その第一関門を形成しているものと考えられるが、これらの糖鎖のシアル酸を含む部分がウイルス感染においては、その吸着のためのリセプターとなってしまう⁸⁾。その場合、角膜・結膜上皮の表層から基底層に向かってウイルスが侵入してくるわけであるが、これに対して角膜・結膜上

皮の中間層から基底層に分布しているシアリダーゼが防御的に働くのかも知れない。例えば、ウイルス膜であるエンベロープと上皮複合糖質との吸着をシアル酸ごと細胞質シアリダーゼが切り離すことによって、ウイルスの侵入を防ぐように働くのかも知れない。著者らは細胞のアポトーシスと細胞質シアリダーゼの関係についても注目しており⁹⁾、これらの視点も取り入れながら角膜・結膜上皮における細胞質シアリダーゼの役割について、今後の研究で明らかにしていく必要がある。

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) Miyagi T, Sagawa J, Konno K, Tsuiki S: Immunological discrimination of intralysosomal, cytosolic, and two membrane sialidase present in rat tissues. J Biochem 107: 794—798, 1990.
- 3) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Yanagita T, Iwakiri N, Ozawa M, et al: Immunohistochemical localization of cytosolic sialidase in photoreceptor cells. Jpn J Ophthalmol 40: 187—191, 1996.
- 4) Aminoff D, Bruegge WFV, Bell WC, Sapolis K, Williams R: Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. Proc Natl Acad Sci USA 74: 1521—1524, 1977.
- 5) 宮城妙子：シアリダーゼ遺伝子。永井克孝(編)：糖鎖 I. 糖鎖と生命。東京化学同人, 東京, 186—195, 1994.
- 6) 上原文行, 鮫島宗文, 鶴木一彦, 内匠勝秀, 大庭紀雄：サル角膜・結膜上皮および結膜杯細胞のレクチン結合性のノイラミニダーゼ処理による変化。日眼会誌 92：1354—1358, 1988.
- 7) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu5Ac (α 2, 3) Gal (β 1, 4) GlcNAc sequence with the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*: Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in α 2, 3- and α 2, 6-linkage. J Histochem Cytochem 37: 1577—1588, 1989.
- 8) 鈴木康夫：ウイルス・原虫感染と糖鎖。福田 穰(編)：糖鎖研究の最先端。羊土社, 東京, 129—148, 1996.
- 9) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Yanagita T, Okubo A, Iwakiri N, et al: Glycohistochemical study of light-induced retinal degeneration. In: LaVail MM, et al (Eds): Degenerative Retinal Diseases. Plenum Publishing Corp, New York, in press.