

レクチン組織染色法を用いた結膜杯細胞複合糖質の糖鎖解析

岩切 直人¹⁾, 上原 文行¹⁾, 大庭 紀雄¹⁾, 津山新一郎²⁾, 村田 長芳²⁾¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾鹿児島大学医学部第二解剖学教室

要 約

多種類のビオチン標識と蛍光標識レクチンによる二重染色法および単独染色法を用いて、ヒト結膜杯細胞におけるO-結合型とN-結合型の複合糖質の分布形態を検索した。O-結合型糖鎖を認識する peanut agglutinin とN-結合型糖鎖を認識する *Erythrina cristagalli* agglutinin は、二重染色によって同一の結膜杯細胞内部に結合した。したがって、同一の杯細胞が両方の型の糖鎖をもつ複合糖質を産生、含有していることが判明した。一方、シアル酸 α 2,3 ガラクトースを認識する *Maackia*

amurensis lectin II が杯細胞内部に結合したのに対し、シアル酸 α 2,6 ガラクトースを認識する *Sambucus nigra* agglutinin は結合しなかった。これらの所見から、ヒト結膜杯細胞の複合糖質糖鎖末端のガラクトースには、シアル酸は α 2,3 結合していることが判明した。(日眼会誌 101: 83-86, 1997)

キーワード: 結膜, 杯細胞, 複合糖質, レクチン

Lectin Histochemistry of the Glycoconjugates in Conjunctival Goblet Cells

Naoto Iwakiri¹⁾, Fumiyuki Uehara¹⁾, Norio Ohba¹⁾,
Shin-ichiro Tsuyama²⁾ and Fusayoshi Murata²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine²⁾Department of Anatomy II, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

The distribution of O- and N-linked glycoconjugates in human conjunctival goblet cells was examined histochemically using biotinylated and fluorescence-labeled lectins simultaneously. Both peanut agglutinin and *Erythrina cristagalli* agglutinin, specific for O- and N-linked sugar chains, respectively, bound to the same goblet cell, which demonstrated that a conjunctival goblet cell produces and contains both types of glycoconjugates. *Maackia amurensis* lectin II, specific for sialic acid

α 2, 3 galactose, bound to the goblet cells, while *Sambucus nigra* agglutinin, specific for sialic acid α 2, 6 galactose, did not. This observation suggested that the terminal galactosyl residue of the glycoconjugates is α 2, 3-sialylated in the human conjunctival goblet cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 83-86, 1997)

Key words: Conjunctiva, Goblet cell, Glycoconjugate, Lectin

I 緒 言

結膜の杯細胞で産生・分泌される複合糖質は、涙液の維持をはじめとする種々の生理的機能の発現に関与している¹⁾。複合糖質は、その糖鎖構造の違いから大きくO-結合型とN-結合型の2種類に分類される。著者らは、結膜杯細胞内の複合糖質の糖鎖について、特定の糖鎖構造を認識して結合する性質を有するレクチンを用いて組織化学的に検索してきた²⁾³⁾。しかしながら、一つの杯細胞でO-

結合型とN-結合型の複合糖質がともに産生されるのか、あるいはO-結合型とN-結合型の複合糖質を、それぞれ別個に産生する異なった種類の杯細胞が存在するののかという点に関しては、未だ説明するに至っていない。網膜光受容体間基質では、O-結合型とN-結合型の複合糖質は異なった分布様式をとり、それぞれ異なった生理学的機能を担っている。すなわち、O-結合型は安定な網目状構造を形成し、視細胞と網膜色素上皮細胞の間の接着に関与しているのに対し、N-結合型は顆粒状成分として同定さ

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 岩切 直人
(平成8年2月6日受付, 平成8年7月29日改訂受理)

Reprint requests to: Naoto Iwakiri, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken 890, Japan

(Received February 6, 1996 and accepted in revised form July 29, 1996)

れ,明・暗でその分布が変化し,両細胞間の物質輸送に関与していることが推定されている⁴⁾.結膜杯細胞においても,O-結合型とN-結合型の複合糖質の分布形態が異なっている可能性があることから,それらの生理的役割を解明するためにも,O-結合型とN-結合型の複合糖質の結膜杯細胞内局在分布の詳細について明らかにしておく必要がある.そこで,O-結合型糖鎖を認識するレクチンである peanut agglutinin (PNA)⁵⁾と,N-結合型糖鎖を認識するレクチンである *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA)⁶⁾を,それぞれ異なった標識のものを用いて同一結膜組織切片に反応(二重染色)させることによって,O-結合型とN-結合型の複合糖質の結膜杯細胞内局在分布の相互関係を検索した.一方,これらのレクチンは,シアル酸が複合糖質の糖鎖末端に存在すると,その結合が阻害されて減弱してしまい,シアル酸を含有する複合糖質は検出できない可能性があることから,シアル酸を認識するレクチンを用いた組織染色も並行して実施し,実験結果の解析を行った.

II 実験方法

翼状片手術(10例)および白内障手術(10例)の際に得られた結膜組織を,3%グルタルアルデヒド/燐酸緩衝液(PBS;0.1M,pH 7.4)を用いて浸漬固定し,アルコール脱水,パラフィン包埋した.5 μ mの組織切片を作製,脱パラフィンし,0.2%過酸化水素/メタノールで内因性 peroxidase 活性を,2%ウシ血清アルブミンでレクチンの非特異的吸着を抑制した.次に,10 μ g/mlの濃度になるようにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解したビオチン標識ピーナツ凝集素(PNA),ビオチン標識腸内細菌共通抗原(ECA),ビオチン標識 *Sambucus nigra* agglutinin(SNA),あるいはビオチン標識 *Maackia amurensis* lectin II(MALII)を,連続する組織切片にそれぞれ室温で1時間ずつ反応させた.PBSを用いて洗浄した後,Vectastain Elite ABC Kit(Vector社,Burlingame,CA,米国)と diaminobenzidine を用いて発色させた.次に,これらのビオチン標識レクチンで染色した組織切片をPBSで洗浄した後,さらに蛍光標識レクチン

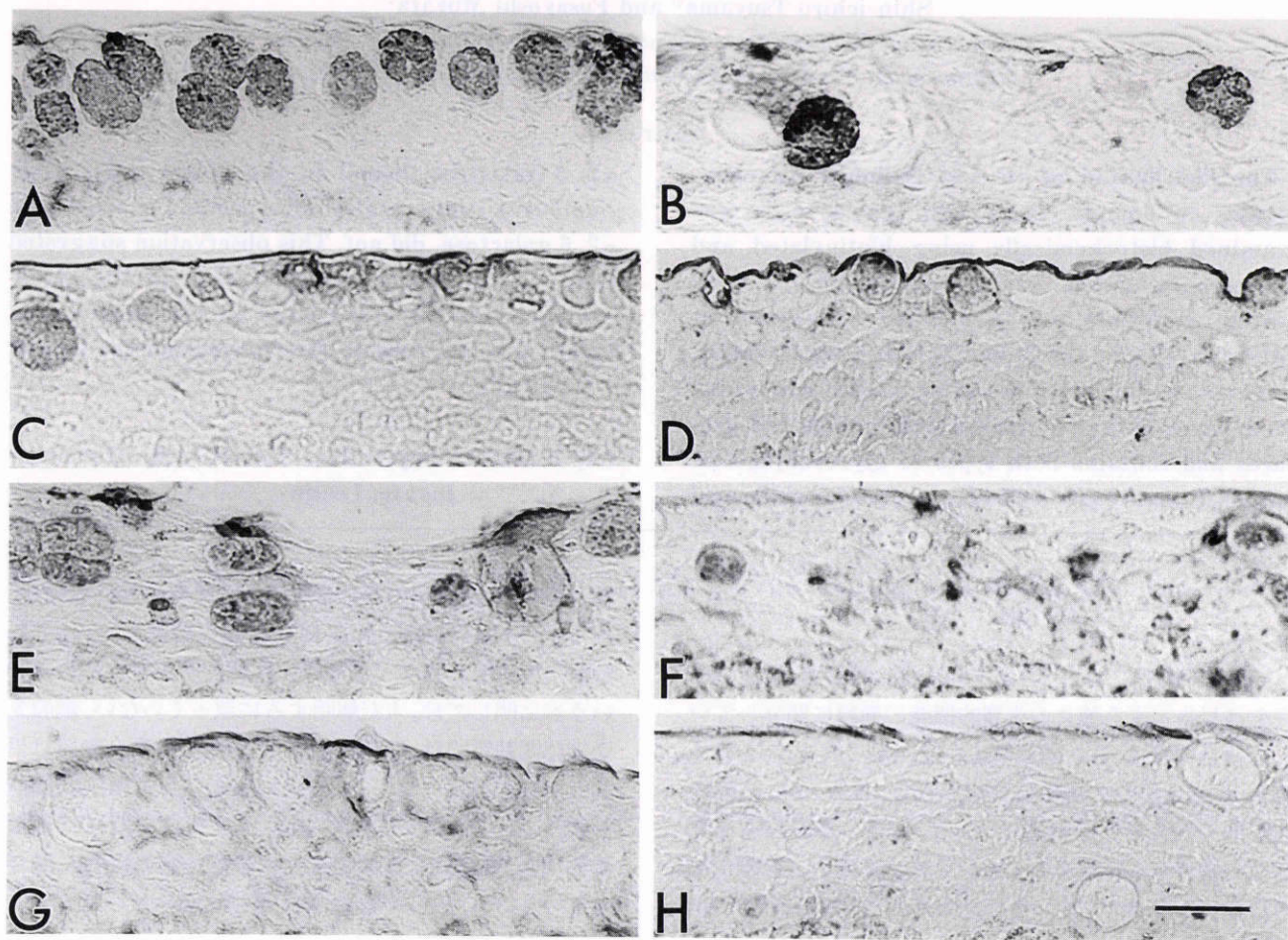


図1 ヒト結膜組織のビオチン標識レクチン染色像.

翼状片組織(A,C,E,G)の方が,白内障の手術で得られた結膜組織(B,D,F,H)よりも多くの杯細胞が分布している.Peanut agglutinin(A,B),*Erythrina cristagalli* agglutinin(C,D),*Maackia amurensis* lectin II(E,F)が,それぞれ杯細胞内部に顆粒状に結合している.*Sambucus nigra* agglutininは,杯細胞には結合していない(G,H).バーは40 μ m

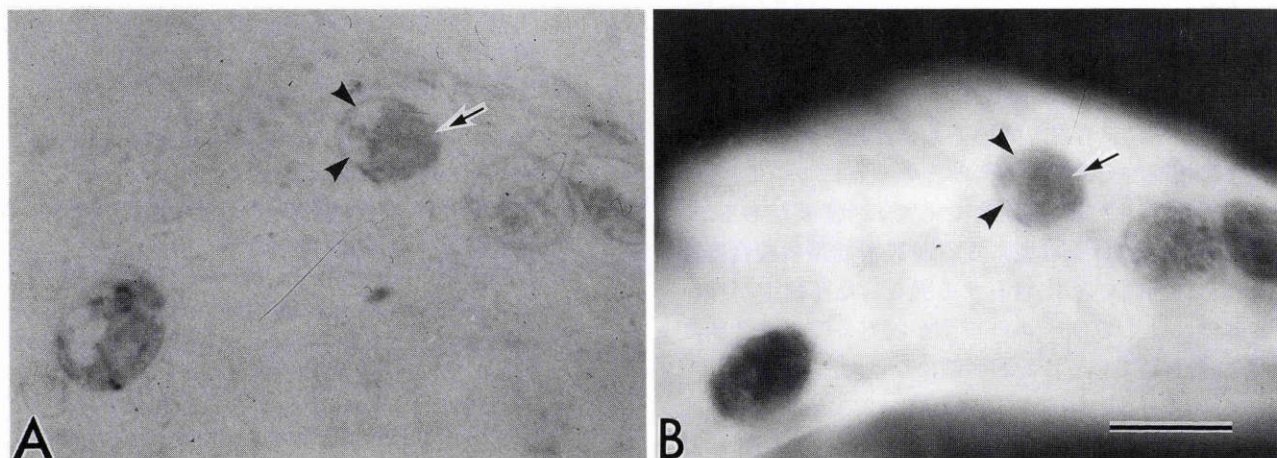


図2 ヒト結膜組織のレクチン二重染色像。

ビオチン標識 peanut agglutinin (PNA) 染色 (A) した後、同一組織切片を蛍光標識 *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) 染色 (B) している。杯細胞内部の PNA が結合しなかった部位 (A, 矢じり) に、ECA が結合している (B, 矢じり)。PNA が結合した部位 (A, 矢印) に対応する部分にはほとんど ECA は結合していない (B, 矢印)。蛍光染色像では、グルタルアルデヒド固定による自発蛍光が結膜上皮全体に観察される (B)。バーは 40 μ m

を室温で1時間反応させた。この場合、最初にビオチン標識 PNA で染色した組織切片には蛍光標識 ECA を、ビオチン標識 ECA で染色した切片には蛍光標識 PNA を、それぞれ二重染色として反応させた。一方、ビオチン標識レクチン、あるいは蛍光標識レクチンの単独染色も実施した。これらのビオチン標識および蛍光標識レクチンは、いずれも Vector 社製のものをを用いた。PBS を用いて洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。次に、永久標本として封入処理した後、蛍光写真撮影した部位と同一部位を光学顕微鏡を用いて撮影し、両者の染色像について比較、検討した。対照としては、それぞれのレクチン溶液に 0.2 M となるようにハプテン糖 (PNA, ECA: D-ガラクトース; MALII: 3'-シアリルラクトース; SNA: 6'-シアリルラクトース) を加えた溶液を反応させ、ハプテン糖の存在下でレクチン結合の強さが減弱している像が観察された場合、その部位を特異的レクチン結合部位と判定した。なお、結膜組織の採取は、術前に了解を得た患者について行った。

III 結 果

翼状片と白内障の手術で得られた結膜組織の杯細胞の分布密度に関しては、統計学的には検討はしていないが、顕微鏡の1視野当たりに観察される杯細胞の数は、一般に前者の方が多い傾向がみられた。しかしながら、個々の杯細胞のレクチン染色性に関しては、両者の間に明確な差は検出されなかった。すなわち、すべての症例の結膜杯細胞が下記の共通のレクチン染色像を示した。一方、下記のレクチン染色の強さは、それぞれのハプテン糖の存在下で減弱する像が観察されたことから、それぞれ特異的に反応、結合したものと判定した。

図1に、翼状片と白内障の手術で得られた結膜組織の

杯細胞のビオチン標識レクチン単独染色像を示した。翼状片組織 (図1 A, C, E, G) の方に、白内障の手術で得られた結膜組織 (図1 B, D, F, H) に比べて、より多くの杯細胞が分布している像が観察された。ビオチン標識 PNA は、杯細胞内部に顆粒状に結合した (図1 A, B)。ビオチン標識 ECA (図1 C, D) とビオチン標識 MALII (図1 E, F) も、杯細胞内部に顆粒状に結合した。ビオチン標識 SNA は、結膜表面に線状に結合したが、杯細胞には結合しなかった (図1 G, H)。

図2に、白内障の手術で得られた結膜組織をビオチン標識 PNA で染色した後、蛍光標識 ECA を用いて二重染色した像を示した。杯細胞内部のビオチン標識 PNA が結合しなかった部位 (図2 A, 矢じり) に蛍光標識 ECA の染色像が観察された (図2 B, 矢じり)。一方、ビオチン標識 PNA が結合した部位 (図2 A, 矢印) に対応する部分には、ほとんど蛍光標識 ECA は結合しなかった (図2 B, 矢印)。すなわち、一般にビオチン標識 PNA で染色されていない部分に二重染色によって蛍光標識 ECA が結合して、両者の結合分布は互いに相補的な位置関係にあるように見えた。蛍光顕微鏡観察下では、グルタルアルデヒド固定によると考えられる結膜上皮全体の麦わら色の自発蛍光が強かったが、蛍光標識レクチンが結合した黄緑色の蛍光とは明瞭に区別することが可能であった。

IV 考 按

ガラクトース β 1,3 N-アセチルガラクトサミン (O-結合型糖鎖) を認識する PNA⁵⁾ と、ガラクトース β 1,4 N-アセチルグルコサミン (N-結合型糖鎖) を認識する ECA⁶⁾ が、ともに同一杯細胞の内部に結合したことから、O-結合型と N-結合型の糖鎖が一つの杯細胞内に共存することが判明した。しかしながら、両者は互いに相補的な

分布形態をとっているように見えたことから、一つの蛋白に O-結合型と N-結合型の両方の糖鎖が結合して存在しているというよりも、複数の O-結合型と N-結合型の複合糖質が別個に存在しているものと推定される。両者が完全に相補的であるかどうかという点については、今後、電子顕微鏡レベルで明らかにしていく必要があるが、本研究によって、O-結合型あるいは N-結合型の複合糖質をそれぞれ別個に産生、含有する異なった杯細胞が存在するのではなく、同一の杯細胞が両方の型の複合糖質を産生、含有していることが明確になった。

次に、結膜杯細胞内部にシアル酸 α 2,3 ガラクトースを認識する MALII⁷⁾が結合したのに対し、シアル酸 α 2,6 ガラクトースを認識する SNA⁸⁾は結合しなかったことから、ヒト結膜杯細胞の複合糖質の糖鎖末端のガラクトースに、シアル酸は α 2,3 結合していることが判明した。著者らは、ラットの結膜杯細胞には MALII だけでなく、SNA も結合する染色像を観察している(未発表データ)。結膜杯細胞内部の複合糖質糖鎖末端のシアル酸の結合様式は、種によって異なっていることが推定される。しかしながら、本研究から、同じヒト組織の場合、翼状片と正常結膜との間には、杯細胞内部の複合糖質糖鎖末端のシアル酸の結合様式の差はみられないことが明らかになった。

文 献

- 1) van Haeringen NJ: Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol* 26: 84—96, 1981.
- 2) Kawano K, Uehara F, Sameshima M, Ohba N: Application of lectins for detection of goblet cell carbohydrates of human conjunctiva. *Exp Eye Res* 38: 439—447, 1984.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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) De Boeck H, Loontjens FG, Lis H, Sharon N: Binding of simple carbohydrates and some N-acetyllactosamine-containing oligosaccharides to *Erythrina cristagalli* agglutinin as followed with a fluorescent indicator ligand. *Arch Biochem Biophys* 234: 297—304, 1984.
- 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 leucoagglutinin 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) Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ: The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac (α 2-6) Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 262: 1596—1601, 1987.