

錐体視細胞外節へのフコース認識レクチンの選択的結合分布

上原 文行, 岩切 直人, 鮫島 宗文, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

要 約

ラットおよびヒト網膜の視細胞層におけるフコース含有複合糖質の分布について、L-フコース α 1,6 残基を認識する *Aleuria aurantia* lectin (AAL) を用いてレクチン組織化学的に検索した。ラット網膜では、視細胞外節先端部と内節基底部にほぼびまん性に強い AAL の染色像が観察されるとともに、一部の視細胞(分布の割合から錐体と推定される)の外節に、そのほぼ全長にわたる AAL の染色像が観察された。ヒト網膜では、視細胞内節

の基底部と網膜色素上皮にほぼびまん性に強い染色像が観察されたが、視細胞外節に関しては錐体だけに染色像が観察された。本研究によって、錐体視細胞外節には L-フコース α 1,6 残基を糖鎖末端に有する複合糖質が分布していることが判明した。(日眼会誌 101: 853-856, 1997)

キーワード: 視細胞, フコース, 複合糖質, レクチン

Selective Binding of Fucose-recognizing Lectin on the Cone Photoreceptor Outer Segments

Fumiyuki Uehara, Naoto Iwakiri, Munefumi Sameshima and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

The distribution of fucose-containing glycoconjugates in the photoreceptor cell layer of rat and human retinas was examined by lectin histochemistry using *Aleuria aurantia* lectin (AAL), which recognizes L-fucose α 1,6 residue. In the rat retina, AAL diffusely bound to the apical outer segments and to the basal inner segments, whereas it bound to the entire outer segments of other photoreceptors, which were considered to be cones due to their proportion. In the human retina, AAL bound dif-

fusely to the basal inner segments and to the retinal pigment epithelia, but it bound selectively to the outer segments of the cones. The present findings revealed that the glycoconjugates, whose sugar chains contain L-fucose α 1,6 residue on their termini, are present in the cone outer segments. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 853-856, 1997)

Key words: Photoreceptor, Fucose, Glycoconjugate, Lectin

I 緒 言

細胞表面あるいは細胞外基質に分布する複合糖質は、細胞接着、細胞間物質輸送、細胞増殖の促進・抑制、食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¹⁾。著者らは先に、網膜視細胞の内・外節の表面およびその周囲の光受容体間基質に分布する複合糖質の糖鎖末端にシアル酸が杆体視細胞では存在するのに対し、錐体視細胞では存在しないことを数段階の糖鎖組織化学的研究によって確立してきた^{2)~4)}。さらに、シアル酸含有複合糖質の糖鎖末端のシア

ル酸残基の形成に関与するシアル酸転移酵素のメッセンジャーRNA(mRNA)⁵⁾と細胞質シアリダーゼ⁶⁾も、視細胞層においては杆体内節に選択的に分布することを明らかにした。

ところで、複合糖質の糖鎖末端にはシアル酸のかわりにフコースが結合分布しているものもある¹⁾。シアル酸とフコースは一つの複合糖質の糖側鎖に共存して分布することもあるが、一つの糖に関してはシアル酸かフコースのいずれか一方しか結合できない¹⁾。したがって、錐体視細胞の内・外節の表面およびその周囲の光受容体間基質に分布する複合糖質の糖鎖末端には、シアル酸のかわ

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6月3日受付, 平成9年6月23日受理)

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 June 3, 1997 and accepted in June 23, 1997)

りにフコースが結合分布している可能性がある。実際過去に、フコースを網膜内に取り込ませると多くの動物種で錐体視細胞外節に選択的に移行すること⁷⁾、錐体ジストロフィー患者でL-フコシダーゼ活性が低いこと⁸⁾、および錐体視細胞の多い網膜黄斑部でL-フコシダーゼ活性が高いこと⁹⁾を示した報告がみられることから、視細胞層においては錐体にフコースが選択的に分布している可能性が高い。しかしながら、著者ら²⁾の研究を含め過去のレクチン組織化学的研究において、フコースに特異的なレクチンが錐体に特異的に結合する観察像は残念ながら得られていない。過去の研究で、著者やその他の研究者が使用した *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-1) と *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) は、L-フコース α 1,2 残基を認識するレクチンである¹⁰⁾。錐体に分布する複合糖質の糖鎖末端においては、フコースが α 1,2 以外の結合様式で存在しているために、UEA-1 と LTA の錐体視細胞への選択的結合性が検出できなかった可能性がある。そこで、過去に視細胞のレクチン組織化学的研究に使用された報告のみられない、L-フコース α 1,6 残基を認識する *Aleuria aurantia* lectin (AAL)¹¹⁾ のラットおよびヒト網膜の視細胞層における結合分布について検索してみた。

II 方 法

成熟白色 Wistar ラット 4 匹の網膜と、脈絡膜悪性黒色腫のために眼球摘出した 2 例の健常部網膜を試料としてレクチン組織化学的検索を実施した。眼球を 10% ホルマリン液を用いて一晩浸漬固定した後、アルコール脱水してパラフィン包埋した。5 μ m の厚さの組織切片を作製し、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 0.05% Tween 20/リン酸緩衝液 (PBS: 0.01 M, pH 7.4) 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 mg/ml の濃度になるように 0.05% Tween 20/PBS に溶解したビオチン標識 AAL (生化学工業) を組織切片に室温で 1 時間反応させた。対照実験としては、ハプテン糖の L-フコースを 0.1 M の濃度になるように混合したビオチン標識 AAL の溶液を反応させた。PBS を用いて洗浄した後、Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社) 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。網膜視細胞層におけるビオチン標識 AAL の結合分布について、光学顕微鏡を用いて観察した。

III 結 果

ラット網膜では、視細胞外節先端部 (図 1 A の a) と内節基部 (図 1 A の b) にほぼびまん性に強い AAL の染色像が観察されるとともに、一部の視細胞外節に、そのほぼ全長にわたる AAL の染色像が散在性に観察された (図 1 A の矢印)。ハプテン糖の L-フコースの存在下で

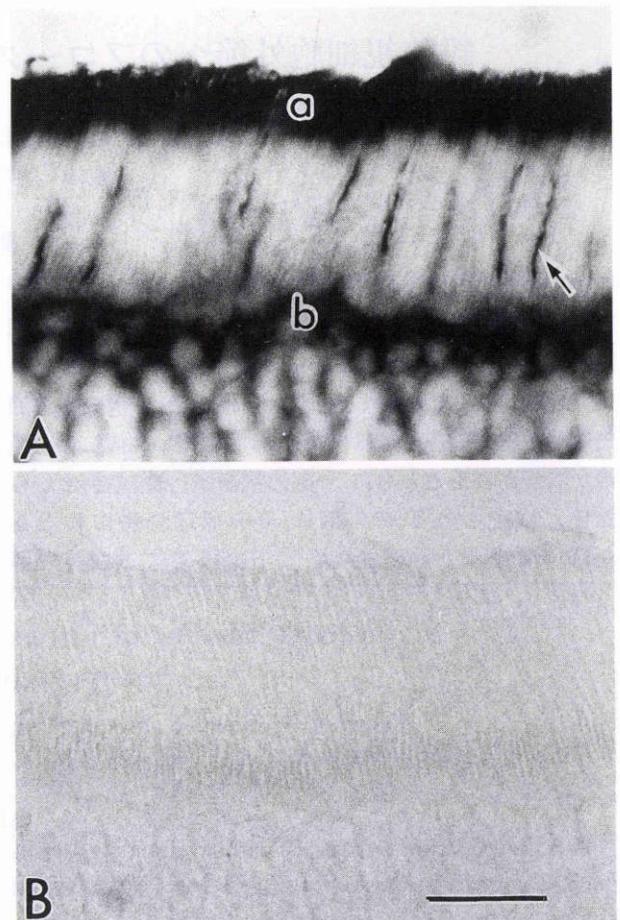


図 1 ラット網膜視細胞層のビオチン標識 *Aleuria aurantia* lectin (AAL) 染色像。

A: AAL 染色像, B: A の陰性対照像. a: 視細胞外節先端部, b: 視細胞内節基部, 矢印: 視細胞外節. バーは 20 μ m

は、ほとんど微弱な発色像しか観察されなかった (図 1 B)。

ヒト網膜の剝離部の AAL 染色像を観察した場合、視細胞内節の基部 (図 2 A の b) にほぼびまん性に強い染色像が観察されるとともに、視細胞外節に関しては錐体のみ (図 2 A の c) に染色像が観察された。網膜色素上皮細胞に関しては、陰性対照像 (図 2 B) ではメラニン色素の輪郭が判別しやすかったのに対し、AAL の染色像 (図 2 A の a) ではメラニン色素が覆い隠されるようにびまん性に染色されるとともに、メラニン色素存在部よりもさらに外節寄りの色素上皮の突起に相当すると思われる領域まで少し厚めに染色された。L-フコースの存在下では、メラニン色素が色素上皮細胞と視細胞外節の先端部に観察されただけで、ペルオキシダーゼ発色像はほとんど微弱にしか観察されなかった (図 2 B)。

IV 考 按

まず視細胞外節に関して、ラットでは一部のものしか AAL で染色されなかった。その理由は、ヒト網膜視細胞

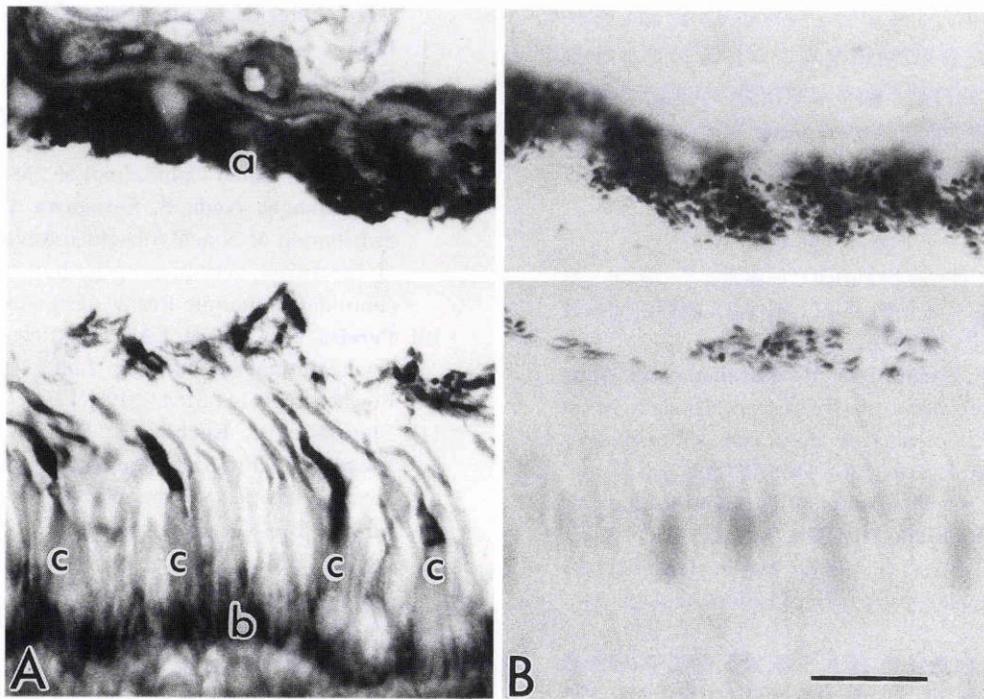


図2 ヒト網膜視細胞層のビオチン標識 AAL 染色像.

A: AAL 染色像, B: A の陰性対照像, a: 網膜色素上皮, b: 視細胞内節基底部分, c: 錐体. パーは 20 μm

外節の染色像の特徴から, AAL が錐体外節に選択的に結合するからであることが判明した. ラット網膜では視細胞の 98.5% が杆体であると報告¹²⁾されており, 錐体視細胞の割合が少ないことから, その外節が散在性に染色されたものと考えられる. 一方, ラット網膜において, 視細胞外節の先端部がびまん性に染色されたが, これはヒト網膜の染色像と対比させた場合, 網膜色素上皮の突起が染色されたものではないかと考えられる. また, ラットとヒト網膜で共通に視細胞内節基底部分びまん性に染色されたが, これは顕微鏡のフォーカスをずらしながら観察したところ, 内節そのものではなく, ミューラー細胞の突起が染色されているようにみえた. 本研究によって, 少なくとも視細胞外節の基底部分から中間部分にかけては AAL が錐体に選択的に結合することが明らかになったが, 外節の先端部分と内節基底部分の AAL 染色部位に関しては, 電子顕微鏡的にそれぞれ網膜色素上皮とミューラー細胞の突起であることを証明する必要がある.

ところで, 錐体外節へのフコース特異的なレクチンの選択的結合分布が過去の報告において, L-フコース α 1, 2 残基を認識する UEA 1 と LTA¹⁰⁾ では検出されなかった²⁾のに対し, 本研究において L-フコース α 1, 6 残基を認識する AAL¹¹⁾ で検出されたことから, 錐体外節に分布する複合糖質の糖鎖末端には L-フコースが α 1, 6 結合した形で存在していることが明らかになった. 過去に眼科領域で AAL を使用した研究に関しては, AAL を家兔の硝子体内に注入して網膜への取り込みを観察した報告¹³⁾がみられるだけである. この研究¹³⁾では, 神経節細胞から視中枢方向への軸索流に乗った AAL の移行につい

ての観察結果だけが記載されている. AAL をレクチン組織化学に使用した研究に関しては, 筋肉¹⁴⁾などの眼以外の組織における結合分布について報告したものが散見される程度であり, 視細胞層におけるフコースの錐体選択的分布をレクチン組織化学的に証明したのは本研究が初めてである.

複合糖質の糖鎖末端には, シアル酸かフコースのいずれかが結合分布している¹⁾. 糖鎖末端におけるシアル酸とフコースの生理学的役割に関しては, 両者とも悪性腫瘍の病態との関連で研究が進められているものの¹⁾, 未だ明確にされてはいない. 本研究で確認されたフコースの錐体視細胞特異性と, 著者らがこれまで確立してきたシアル酸の杆体視細胞特異性とを対照させた研究を進めていくことにより, 両者の生理学的役割に関する相乗的な研究発展が期待できる. すなわち, 錐体と杆体視細胞は生理学的に大きく異なっていることから, それらの差異の発現にフコースとシアル酸の役割を対応させることができれば, この領域の研究が大きく進展する可能性がある. 例えば, 著者らはシアル酸の有する陰性荷電と, 杆体視細胞の高い光感受性との関係について先に考察した⁵⁾. 一方, 連続光照射によって実験的に引き起こされる網膜変性症において, 杆体視細胞が優位に障害されてアポトーシスに陥る現象に, 光照射によって誘発される細胞質シアリダーゼの増加が関与している可能性を指摘した¹⁵⁾. 錐体視細胞にはもともとシアル酸の代謝系が存在していないために, 連続光照射によって障害されにくいのではないかと考えられる. 錐体視細胞のアポトーシスにはフコースの代謝系が関係していることが推定され,

これは連続光照射による影響を受けにくいのかも知れない。これらの点を含め、糖鎖末端におけるシアル酸とフコースの生理学的役割と様々な眼疾患の病態との関係について、今後の研究によって明らかにしていきたい。

本研究は、文部省科学研究費(基盤C 09671809)の補助によって行った。

文 献

- 1) 福田 穰: 糖鎖生物学の新しい展開とその医学・薬学領域における意義. 福田 穰(編): 糖鎖研究の最先端. 羊土社, 東京, 10-23, 1996.
- 2) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescencelabeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113-123, 1983.
- 3) Uehara F, Muramatsu T, Sameshima M, Kawano K, Koide H, Ohba N: Effects of neuraminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. *Jpn J Ophthalmol* 29: 54-62, 1985.
- 4) 上原文行, 鮫島宗文, 鷺木一彦, 大久保明子, 柳田豊子, 菅田昌則, 他: Amaranthin 染色を用いたヒト網膜視細胞のO-結合型複合糖質の同定. *日眼会誌* 99: 286-288, 1995.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Bunt AH, Klock IB: Comparative study of ^3H -fucose incorporation into vertebrate photoreceptor outer segments. *Vision Res* 20: 739-747, 1980.
- 8) Hayasaka S, Nakazawa M, Okabe H, Masuda K, Mizuno K: Progressive cone dystrophy associated with low α -L-fucosidase activity in serum and leukocytes. *Am J Ophthalmol* 99: 681-685, 1985.
- 9) Hayasaka S, Noda S, Setogawa T: Regional distribution of N-acetyl-D-glucosaminidase and α -L-fucosidase activities in the human retina and choroid. *Ophthalmic Res* 20: 266-268, 1988.
- 10) Pereira ME, Kabat EA: Specificity of purified hemagglutinin (lectin) from *Lotus tetragonolobus*. *Biochemistry* 14: 3184-3192, 1974.
- 11) Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A: Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J Biol Chem* 260: 4688-4693, 1985.
- 12) LaVail MM: Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15: 64-70, 1976.
- 13) Ohlson E, Nilsson E, Karlsson JO: Uptake and anterograde axonal transport of *Aleuria* lectin in retinal ganglion cells of the rabbit. *J Neurochem* 44: 1785-1790, 1985.
- 14) Kirkeby S, Moe D, Bog-Hansen TC: Fucose expression in skeletal muscle: A lectin histochemical study. *Histochem J* 25: 619-627, 1993.
- 15) 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 Press, New York, in press.