サル虹彩色素上皮および毛様体無色素上皮の蛍光標識 レクチンを用いた組織化学 (図1. 表1)

上原 文行・鮫島 宗文・鵜木 一彦 (鹿児島大学医学部眼科学教室) 内匠 勝秀・大庭 紀雄

Localization of Fluorescein-labeled Lectin Binding Sites on the Iris Pigmented Epithelium and the Ciliary Nonpigmented Epithelium of the Monkey Eye

> Fumiyuki Uehara, Munefumi Sameshima, Kazuhiko Unoki, Katsuhide Takumi and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

要 約

サル虹彩色素上皮および毛様体無色素上皮基底膜側表面の複合糖質について,8種類の蛍光標識レクチン $(RCA-1,\ PNA,\ Con\ A,\ WGA,\ DBA,\ SBA,\ UEA-1,\ LTA)$ を用いて組織化学的に検索した。両上皮の間にいくつかのレクチンに対する反応性に差異がみられた。すなわち,RCA-1と PNA は虹彩色素上皮にほとんど結合しないのに対し,毛様体無色素上皮には強く結合した。また,これらの毛様体無色素上皮への結合性には部位によって差がみられ,虹彩色素上皮側に近付くにつれて結合の強さが減弱していくのが観察された。 $Con\ A$ および WGA は両方の上皮とも結合したが,毛様体無色素上皮の方により強く結合した。DBA,SBA,UEA-1および LTA はいずれの上皮とも結合しなかった。 (日眼 92:112—114,1988)

キーワード:虹彩色素上皮、毛様体無色素上皮、レクチン、組織化学、複合糖質

Abstract

The binding of eight fluorescein-labeled lectins to the iris pigmented epithelium and the ciliary nonpigmented epithelium of the monkey eye was investigated using a post-embedding staining method. Ricinus communis agglutinin-1 (specific for β -galactosyl residues) and peanut agglutinin (specific for Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc) bound to the basal surfaces of the ciliary nonpigmented epithelium, whereas they did not bind to those of the iris pigmented epithelim. The binding intensities of these lectins to the ciliary nonpigmented epithelium gradually decreased towards the iris pigmented epithelium. The findings suggest a substantial difference in epithelial surface glycoconjugates between the iris and the ciliary body. Concanavalin A and wheat germ agglutinin bound similarly to both tissues, whereas Dolichos biflorus agglutinin, soybean agglutinin, Ulex europaeus agglutinin-1, and Lotus tetragonolobus agglutinin did not bind to either of the tissues. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:112—114, 1988)

Key words: Iris pigmented epithelium, Ciliary nonpigmented epithelium, Lectin histochemisty, Glycoconjugate, Monkey

別刷請求先:890 鹿児島市宇宿町1208—1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行 (昭和62年7月20日受付) Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med. 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan (Accepted July 20, 1987)

I 緒 言

細胞表面の複合糖質は、細胞の増殖、発生・分化、細胞接着、貪食、細胞間認識など種々の重要な生理学的役割を担っていると考えられている¹⁾²⁾. 毛様体上皮細胞は、房水産生機能のほか種々の物質の能動輸送、あるいは貪食機能などを有している^{3)~6)}. 毛様体上皮細胞においても、とくに無色素上皮細胞の基底膜側に複合糖質が存在し、上記の機能に関与している可能性が高い. 一方、レクチンは糖鎖の配列を認識して特異的に結合するという特性をもち、細胞表面の複合糖質の解析に広く応用されている⁷⁾. 筆者らは、虹彩色素上皮及び毛様体無色素上皮表面の複合糖質について、レクチン組織化学的に検索した結果、両者の間に差異が存在することを明らかにしえたので報告する.

II 実験方法

4頭の=ホンザル(Macaca fuscata)の4眼球を用いた。ケタラール麻酔下に摘出した眼球を赤道部で二分割,85%アルコール・10%ホルマリン・5%氷酢酸にて24時間固定,アルコールで脱水,パラフィン包埋した。前眼部を含む標本について厚さ 5μ の切片を作製し,下記のレクチン溶液またはコントロールとしてのレクチン・ハブテン糖混合液を15分間浸漬した。燐酸緩衝液で充分洗浄したのち,2eiss 蛍光顕微鏡にて青色励起フィルターを用いて観察した。

使用したレクチンは、すべて蛍光標識レクチンで、E-Y ラボラトリーズ社(U.S.A.)より購入した次の8種類である。ヒママメレクチン(RCA-1)、ピーナツレクチン(PNA)、タチナタマメレクチン(Con A)、コムギハイガレクチン(WGA)、ドリコスマメレクチン(DBA)、ダイズマメレクチン(SBA)、ハリエニンダレクチン(UEA-1)、ミヤコグサレクチン(LTA)、一方、各レクチンの競合阻害剤(ハブテン糖)として、D-ガラクトース(RCA-1、PNA、SBA)、α-メチル-D-マンノシド(Con A)、N-アセチル-D-グルコサミン

(WGA)、N-アセチル-D-ガラクトサミン (DBA)、L-フコース (UEA-1、LTA) を使用した。実験条件としては、Con A: 0.05mg/ml; LTA: lmg/ml で、その他のレクチンは0.1mg/ml、各ハプテン糖は200mM の濃度でそれぞれ使用した。各レクチン染色標本、コントロールとしてのハプテン糖を含むレクチン溶液染色標本とを常に対にして観察し、ハプテン糖存在下で蛍光強度の減弱がみられた場合に、その部位を特異的レクチン結合部位と判定した。

III 結 果

表 1 に、虹彩色素上皮および毛様体無色素上皮の各々のレクチンに対する結合の強さについて、おおよその視覚的に判定した結果について示した。両上皮の間で、 β -ガラクトースに特異的に結合する RCA-18)と、 $Gal\ \beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc に特異的に結合する PNA^{9} の反応性に顕著な差がみられた。すなわち、これらのレクチンによって虹彩色素上皮はほとんど染色されないの

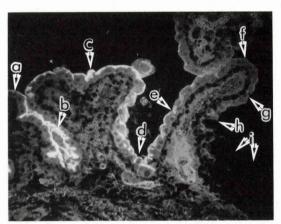


図1 毛様体無色素上皮および虹彩色素上皮の FITC-PNA染色像. 毛様体無色素上皮基底膜側表面が強く染色されている(a~e). 虹彩側に近ずくにつれてその染色性が減弱するとともに(e-h), hから始まる虹彩色素上皮基底膜側表面(h~i)はほとんど染色されておらず,暗くみえる.

表1 サル虹彩色素上皮および毛様体無色素上皮の蛍光標識レクチン染色像

| レクチン | RCA-1 | PNA | Con A | WGA | DBA | SBA | UEA-1 | LTA |
|---------------------|-------|-----|-------|-----|-----|-----|-------|-----|
| 虹彩色素上皮 (基底膜表面) | - | - | ± | + | - | - | - | _ |
| 毛様体無色素上皮 (基底膜表面) | # | ## | + | + | - | - | - | - |

#:最強度; #:強度; +:弱度; ±:最弱度; -:陰性

に対し、毛様体無色素上皮では基底膜、あるいはその表面に強い反応像が観察された。また同じ毛様体無色素上皮でも、部位によってその反応性が異なり、虹彩色素上皮側に近ずくにつれて、次第にその強さが減弱していくのが観察された(図1). Con A および WGA は両方の上皮とも反応がみられたが、その染色性は虹彩色素上皮に比べ毛様体上皮の方が強かった。DBA、SBA、UEA-1および LTA は両方の上皮とも反応はほとんど観察されなかった。

IV 考 按

本研究において、虹彩色素上皮と毛様体無色素上皮 の間で RCA-1および PNA の染色性に強い差がみら れたこと, すなわち毛様体無色素上皮には強い反応が みられたのに対し、虹彩色素上皮ではほとんど反応が みられなかったことが注目に値する。RCA-1は、血清 型複合糖質に、PNA は粘液型複合糖質に結合すると されているが、両方の型の複合糖質とも毛様体無色素 上皮の方に多いことが示唆される. また, 細胞表面の 複合糖質は, 貪食をはじめとして種々の細胞機能に関 係していることから, 虹彩色素上皮に比べ毛様体無色 素上皮はこれらの機能活性が高いことが考えられ、こ れまでの報告3)~6)に一致する結果と思われる。一方,筆 者らは、これらの組織のレクチン結合性のノイラミニ ダーゼ処理による変化についても予備実験的に検索し ているが、虹彩色素上皮のレクチン結合性が増強する ことはなかった。このことは、虹彩色素上皮の WGA (シアル酸および GlcNAc に特異的10) に対する結合 性が弱かったことからも予想されたことであるが、糖 鎖非還元末端にシアル酸が結合することによって虹彩 色素上皮の RCA-1および PNA の反応性が低いので はなく, その結合する複合糖質そのものが少ないため と考えられる。また、以上のレクチンの強い反応が観察 された毛様体無色素上皮基底側表面が, 基底膜そのも のへのレクチン結合を含んでいるのか、あるいはその 表面のみへの結合なのかについては、光顕的には同定 できなかった。一方、同じ毛様体無色素上皮でも、虹 彩に近い側ではPNA および RCA-1の結合性が弱い ことは、それらの結合する複合糖質が少なく、それら の担っているであろう生理学的作用も低いことが考え られる. この所見は, 毛様体無色素上皮の機能は部位 によって差異のあることを示唆しているものかも知れ ない. また, DBA, SBA, UEA-1, LTA に対する反

応が虹彩色素上皮、毛様体無色素上皮ともに観察されなかったことは、これらのレクチンによって認識される糖鎖である N-アセチル-D-ガラクトサミンや L-フコースがこれらの組織の複合糖質の糖鎖末端に存在しないか、存在しても組織化学的に検出できない程度に微量であることを意味しているであろう。毛様体無色素上皮がムコ多糖を産生しているとの報告****の複合糖質も毛様体上皮が産生している可能性を示唆しており、その毛様体上皮機能との関連性については今後の研究によって明らかにしていく必要があるであろう。

文 献

- Sharon N, Lis H: Glycoproteins: Research booming on long-ignored, ubiquitous compounds. Chemical Engineering News 59:21—44, 1981.
- Hakomiri S: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. Ann Rev Biochem 50: 733—764, 1981.
- 3) 玉井 信:毛様体の生理. あたらしい眼科 4: 599-608, 1987.
- Mizuno K, Hayasaka S: Changes of lysozomal enzymes in the ciliary epithelium by foreign bodies. Exp Eye Res 31: 691—698, 1980.
- 5) 高橋甚吉:後房より毛様体への物質移行に関する 形態学的研究. 日眼 85:1330—1338,1981.
- 6) 小野秀幸,三嶋 弘:培養家鶏胚毛様体無色素上 皮細胞と色素細胞の貪食能.日眼 89:383-390, 1985.
- Uehara F, Sameshima M, Ohba N, et al: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. Exp Eye Res 36: 113—123, 1983.
- 8) **Olsness S:** Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. Methods Enzymology 50: 330—335, 1978.
- Lotan R, Skutelsky E, Sharon N, et al: The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J Biol Chem 250: 8518—8523, 1975.
- 10) Nagata Y, Burger MM: Wheat germ agglutinin: Molecular characteristics and specificity for sugar binding. J Biol Chem 249: 3116—3122, 1974.
- 11) **大西克尚,原 雄造,山名泰生**:毛様体上皮細胞に おけるムコ多糖の産生―光顕および電顕オートラ ジオグラフィー. 日眼 85:1350―1357, 1981.