

ラット水晶体における糖質に関する組織化学的研究 (1)

—正常ラット水晶体のレクチン結合性について—(図8)

鈴木 武敏 (岩手医科大学医学部, 病理学第一講座)

要 約

生後1カ月の正常ラット水晶体における複合糖質糖鎖の性状および分布を, 糖結合特異性の明らかな PNA, RCA, SBA, DBA, ConA, WGA, UEA-I の7種類のビオチン化レクチンを使用し, ABC法で染色し組織化学的に検討した。水晶体上皮細胞の胞体は ConA, WGA で陽性を示したものの, 他のレクチンでは陰性であった。UEA-I を除くすべてのレクチンで水晶体皮質の有核線維は陽性を示し, 特に赤道部の陽性反応が強い傾向を示していた。無核線維では非常に弱い反応しか見られず, 水晶体核部はいずれのレクチンでも染色されなかった。さらに, ConA では有核線維の核膜にも陽性所見を示していた。これらのことから, 水晶体上皮細胞が線維細胞に分化する過程で, その複合糖質糖鎖が変化することが確認され, また, N-アセチルグルコサミンおよびマンノースは上皮細胞から皮質にあまねく分布しているが, N-アセチルガラクトサミンは水晶体皮質に偏在して存在していることが推察された。さらに, 水晶体の代謝は核の中心に向かうにしたがって急激に低下することが考えられた。(日眼会誌 93: 307-314, 1989)

キーワード: レクチン, ラット水晶体, 組織化学, 細胞分化

Lectin Binding Pattern of the Normal Rat Lens

Taketoshi Suzuki

Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Pathology I

Abstract

Paraffin sections of normal rat lenses were stained with seven lectins, using an avidin-biotin-complex (ABC) procedure to study the presence and distribution of specific glycoconjugate in the lens. Epithelial cells were stained with concanavalin A (ConA) and wheat germ agglutinin (WGA). Lens fibers with nuclei were stained with six lectins: peanut agglutinin (PNA), ricinus communis agglutinin (RCA), soybean agglutinin (SBA), dolichos biflorus agglutinin (DBA), ConA and WGA. The equatorial cortex stained heavily, while lens fibers without nuclei stained only slightly. Ulex europeus agglutinin (UEA-I) caused no staining at all. ConA stained the nucleal membrane of lens fibers. These results suggest that glycoconjugate changes during lens cell differentiation, and that high levels of N-acetyl-glucosamine and mannose are distributed in both lens epithelium and lens fibers, but that N-acetyl-galactosamine distribution level is low in the lens epithelium. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 307-314, 1989)

Key words: Lectins, Rat lens, Histochemistry, Cell differentiation

別刷請求先: 348 埼玉県羽生市下岩瀬289 栗原眼科病院 鈴木 武敏
(平成元年1月17日受付, 平成元年1月28日受理)

Reprint requests to: Taketoshi Suzuki, Kurihara Eye Hospital
289 Shimoiwase, Hanyu-shi, Saitama 348, Japan

(Received January 17, 1989 and accepted January 28, 1989)

I 緒 言

レクチンはある一定の糖の構造と特異的に結合する特徴を有しており、この性質を利用して組織あるいは細胞の糖分布を組織化学的に可視化することができる^{1)~3)}。レクチンを使用した複合糖質の組織化学的研究は、眼科領域以外では数多く報告されているが、眼科領域での報告は少ない。なかでも水晶体を対象とした研究は、山本ら⁴⁾、Webster ら⁵⁾の報告などがみられるにすぎず、水晶体における糖質の分布局在に関して詳細に検討した報告はない。組織や細胞にはさまざまな複合糖質が存在し、組織細胞の成長、分化、腫瘍化などによって、その糖鎖構造が変化することが知られている^{1)~3)}。水晶体は非常に明瞭な極性を示して分化する細胞から構成されており、分化に伴う糖鎖構造の変化が存在するはずである。また、白内障の発症に糖代謝異常が深く関わっていることは、臨床的にも実験的にも明らかであり、種々の病態における水晶体の糖鎖構造の変化を検討することは、白内障の発症機序を知るうえで重要である。

そこで、種々の実験的白内障における糖質の変動の検討に先立ち、正常水晶体における糖質の分布局在を明らかにするために、レクチンを使用して組織化学的に検討した。

II 材料および方法

1. 材料

実験には、通常飼料（オリエンタル酵母社）で飼育した、生後1カ月のWistar系雄性ラットを5匹使用した。エーテル麻酔後、ペントバルビタールの腹腔内過量投与を行い、水晶体を含む前眼部を取出した。これを直ちに4%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸

緩衝液（pH 7.4）中に移し、実体顕微鏡下で虹彩を付着させたまま水晶体を分離し、4日間固定した。固定後、型のごとくパラフィンに包埋し、矢状断の方向に厚さ4 μ mの切片を作成した。

2. レクチン染色

使用したレクチンはビオチン化レクチン（Vector Laboratories Inc., USA）で、peanut agglutinin (PNA), ricinus communis agglutinin (RCA), soybean agglutinin (SBA), dolichos biflorus agglutinin (DBA), concanavalin A (ConA), wheat germ agglutinin (WGA), ulex europeus agglutinin I (UEA-I)の7種類である(表1)。avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 試薬はVectastain ABC Kit (Vector Laboratories Inc., USA)を用いた。脱パラフィンした薄切切片をリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄した後、ビオチン化レクチン（10 μ gレクチン/ml）と2時間反応させた。次いでPBSで洗浄後、ABC液と30分間反応させた。再度PBSで洗浄後、3,3'-diaminobenzidine-4HCl (DAB, 0.2mg/ml)-H₂O₂ (0.005%)と10分間反応した。蒸留水にて洗浄して反応を停止した後、ヘマトキシリンで核染し、脱水、封入し、光学顕微鏡下にて観察した。

対照実験として、各レクチンに特異的な阻害糖を0.1Mの濃度で添加して反応させ、レクチン結合性が阻害されることを確認した。また、ABC試薬と単独で反応させ、ABCの非特異吸着がないこと、および、DAB反応のみを行ない、内因性ペルオキシダーゼ活性が水晶体にみられないことをそれぞれ確認した。

III 結 果

水晶体の染色態度に各レクチンによる差がみられた。ラットの固体差による同一レクチンの染色態度は、

表1 レクチンの種類と糖結合特異性

レクチン	起 源	主な糖特異性	阻害糖
UEA-I	ハリエンシダ	α -L-Fuc	L-Fuc
PNA	ピーナツ	β -D-Gal (1 \rightarrow 3)-D-GalNac	Gal
RCA	ヒママメ	β -Gal	lactose
SBA	ダイズ	α -GalNac > β -GalNac	GalNac
DBA	ヒマラヤフジマメ	α -GalNac	GalNac
ConA	タチナタマメ	α -Man > α -Glc	α -MM
WGA	小麦胚	GlcNac β (1 \rightarrow 4) GlcNac, SA	GlcNac

Fuc : fucose Gal : galactose GalNac : N-acetylgalactosamine Man : mannose
Glc : glucose GlcNac : N-acetylglucosamine SA : sialic acid α -MM : α -methyl-D-mannoside

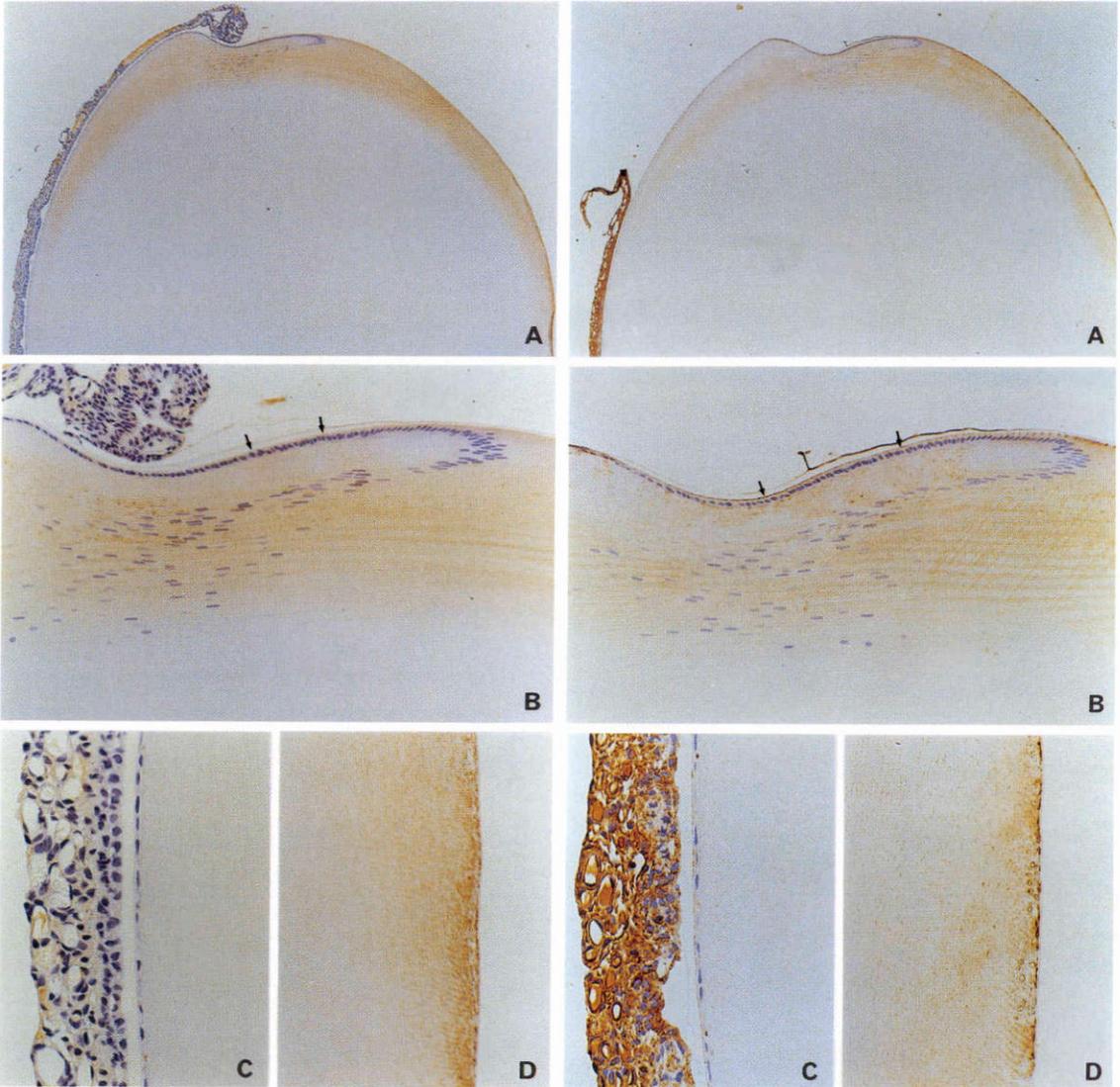


図1～図7 A. 水晶体全体像(×13.2), B. Bow 領域拡大像(×50), C. 前囊側拡大像(×100), D. 後囊側拡大像(×100).

図1 PNA: 増殖帯の核下部の胞体(B矢印)を除き上皮細胞は陰性である.

図2 RCA: 上皮細胞の基底側形質膜が陽性(B, C矢印)を示す.

強弱の差はみられたものの、基本的パターンに大差はなかった。

1) PNA: 水晶体上皮細胞(以下、上皮細胞)の静止領域は陰性であったが、上皮細胞がBow領域に移行する手前の増殖帯の細胞は、細胞核下部の基底側の胞体が陽性に染色されていた。水晶体皮質(以下、皮質)では有核線維は形質膜に沿って明らかな陽性反応を示したが、無核線維は形質膜に沿って微細顆粒状にかす

かに陽性を示すのみで、皮質の深層では陰性であった。同一水晶体線維では、前極側よりも後極側が陽性反応が強く認められた。水晶体核部は陰性であった(図1)。

2) RCA: 上皮細胞は全領域にわたり基底側の形質膜に陽性反応がみられ、特に増殖帯の上皮細胞で強く染色されていた。胞体はPNAと同様の部位で陽性所見が得られた。水晶体皮質および水晶体核部の染色態度はPNAと同様であったが、後囊直下が線状に強く

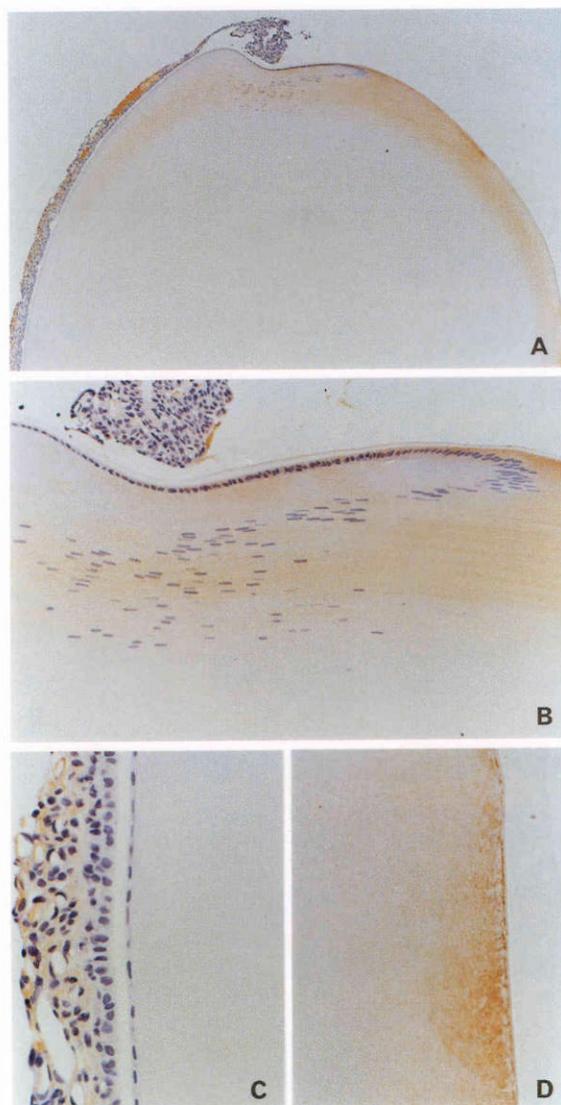


図3 SBA:PNA とほぼ同様の染色性を示すが、前囊側皮質の染色性が弱い。

染色されていた(図2)。

3) SBA: 上皮細胞の陽性反応はPNAと同様の染色性を示した。皮質もPNAとほぼ同様の染色態度を示したが、PNAと比較して前極側皮質の陽性度は弱く、ほとんど陰性であった(図3)。

4) DBA: SBAと同様の染色態度を示していた(図4)。

5) ConA: 上皮細胞は全領域にわたりびまん性に染色された。その染色強度は均一ではなく、増殖帯か

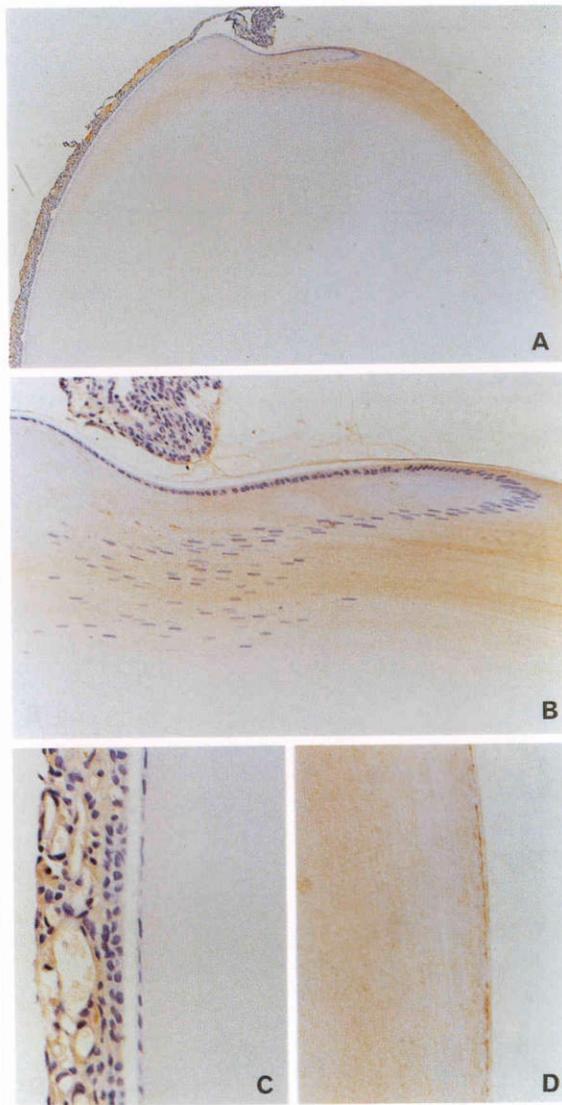


図4 DBA:SBAと同様の染色性を示す。

ら皮質に移行する領域で胞体の陽性度が增強していた。皮質は他のレクチンと同様に有核線維で強く染色されており、この部では核質は染色されなかったものの、核膜が陽性であった。また、後囊直下でRCAと同様に線状に強く染色されていた。無核線維は他のレクチンよりも染色されていたが、水晶体核部は陰性であった(図5)。

6) WGA: 上皮細胞、皮質および後囊直下の染色性は、ConAとほとんど同様であったが、このレクチンでは形質膜が胞体よりも強く染色されており、また、有

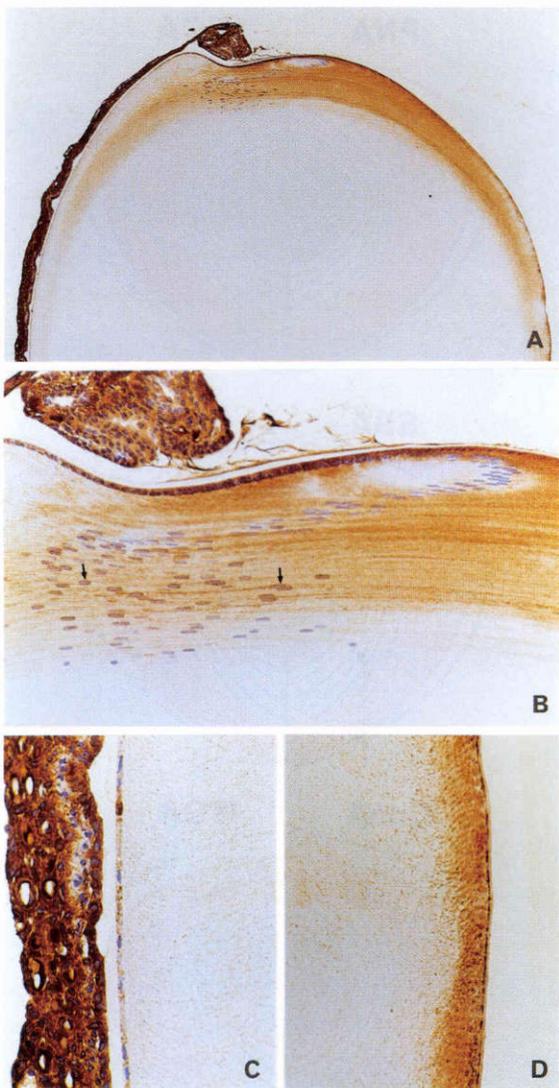


図5 ConA：上皮細胞は全体に陽性を示す。また、核膜が陽性（B矢印）である。

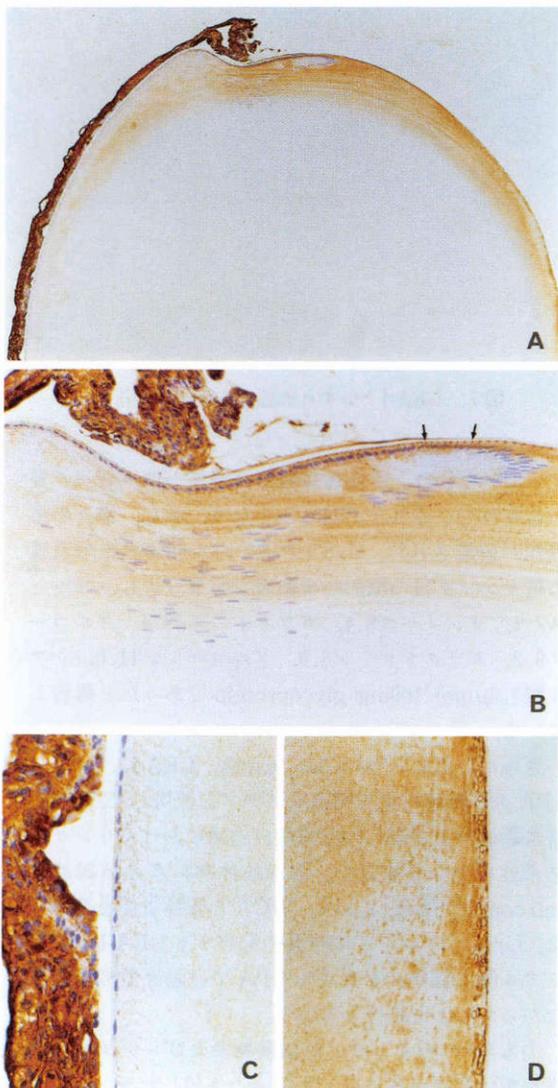


図6 WGA：ConAと同様に上皮細胞が陽性であり、形質膜に強い陽性（B矢印）を示す。

核線維の核膜は陰性であった（図6）。

7) UEA-I：上皮細胞，皮質，水晶体核部いずれも陰性であった（図7）。

8) 対照実験：前記したいずれの方法でも反応は陰性であり，ABCの非特異吸着および内因性ペルオキシダーゼ活性は認められなかった。

以上の各レクチンの染色性を総括すると，①上皮細胞が何らかの染色性を示した—RCA，ConA，WGA，②皮質線維のみが陽性であった—PNA，SBA，DBA，

③いずれの部位にも陰性であった—UEA-I，とおおむね3つのパターンに分類することができた（図8）。また，皮質の染色性を見てみると，陽性反応を示したいずれのレクチンにおいても，赤道部皮質は他の部位よりも強い陽性反応を示した。

IV 考 按

水晶体の糖質に関する生化学的分析は Dische ら⁶⁾の報告から始まり，高久⁷⁾，Kabazawa ら⁸⁾，山本ら⁹⁾に

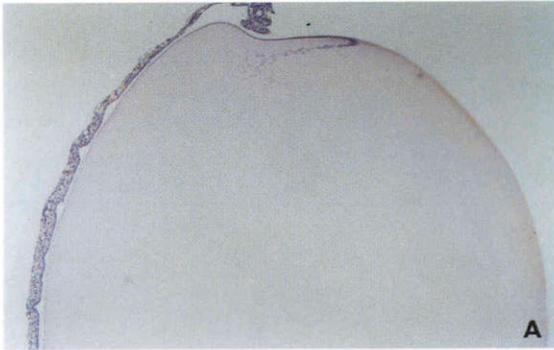


図7 UEA-I: いずれの部位も陰性である.

よって行なわれ、水晶体線維に高濃度の糖タンパク質が含まれていることが明らかとなり、また、種々の単糖類が分離された。山本ら⁹⁾は牛の水晶体線維形質膜の糖タンパク質の糖鎖の単糖類を定量分析し、フコース2.1, マンノース8.4, ガラクトース19.4, グルコース9.2, ガラクトサミン3.9, グルコサミン11.0, シアル酸4.0 μ mol/100mg glycoproteinであったと報告している。

さらに、山本ら⁹⁾はSBA, ConA, UEA-I, WGA, LPAの5種類の蛍光標識レクチンを使用して、家兔正常水晶体および老人性皮質型白内障におけるレクチン結合性について検討し、両水晶体共に水晶体線維のcell coatにSBA, ConA, WGAの陽性蛍光を確認した。しかし、フコースに特異性を有するUEA-Iおよびシアル酸に特異性を有するLPAでは陽性蛍光を示さなかったことを報告している。

山本ら⁹⁾の研究とは、対象動物およびレクチンの標識物質に相違があるが、本実験で使用したラットの水晶体でもUEA-Iのみが陰性であり、その他の共通するレクチンでは山本らの結果と同様に陽性反応を得ることができた。また、今回新たにガラクトースに特異性を有するとされるPNA, RCAの両レクチン、およびN-アセチルガラクトサミンに特異性を有するとされるDBAについても検討したところ、これらについても陽性像を得ることができた。このことから、ラット水晶体にもマンノース, ガラクトース, グルコース, N-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンの糖鎖が存在することが組織化学的に示唆された。フコースに特異性を有するUEA-Iが陰性であったのは、山本ら⁹⁾も指摘しているように、フコースが水晶体中に少量しか存在しないために陽性反応が得られな

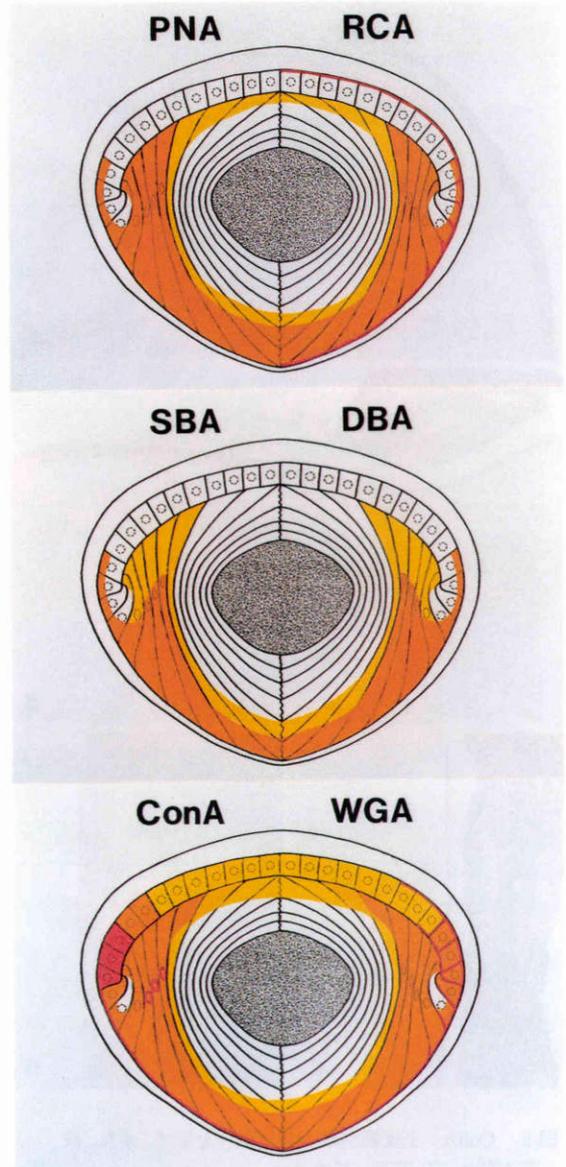


図8 レクチン結合パターン模式図

かったことが考えられるが、レクチンの糖結合性は近接する糖鎖構造などの種々の因子によって影響されることがいわれており²⁾、その可能性も考慮する必要がある。

今までに報告された水晶体の糖質に関する研究は、水晶体全体を対象にしたものがほとんどであり、緒言にも述べたように水晶体における糖質の分布局在を詳細に検討した報告はみられない。そこで本実験ではレ

クチン染色としてビオチン化レクチンのABC法を用いた。この染色方法は可視化したレクチンの局在性を細胞レベルで明瞭に判別することが可能な点で山本ら⁹⁾の使用した蛍光標識レクチンより優れている。そのため水晶体における糖質の局在性について今まで以上に明らかにすることができた。Discheら¹⁰⁾は赤道部の糖質濃度が他の皮質より高いことを報告している。今回の染色結果を見ると、UEA-Iを除くすべてのレクチンで赤道部の陽性反応が他の皮質よりも明らかに強く、Discheらの結果を組織化学的に確認できた。

水晶体は構造的にしばしば皮膚の重層扁平上皮にたとえられる。すなわち、水晶体嚢を基底膜とし、上皮細胞が基底細胞で、皮質細胞が有棘層、水晶体核が扁平上皮細胞における角質層である。皮膚の重層扁平上皮は、その分化によってレクチンの結合パターン、すなわち細胞の複合糖質が変化することが知られている¹¹⁾¹²⁾。そこで本実験でのレクチン結合パターンを、皮膚の重層扁平上皮に関する過去の報告と比較すると、ConA, WGAは基底細胞に相当する上皮細胞および有棘層に相当する皮質細胞に陽性反応を示しており、PNA, SBAは皮質細胞が陽性で上皮細胞が陰性であり、RCAが上皮細胞の基底側に陽性を示し、UEA-Iが陰性であり、角質層に相当する水晶体核部はいずれもレクチンにも陰性であるなど、皮膚の重層扁平上皮とほぼ同一の染色結果が得られた。すなわち皮膚と水晶体の複合糖質糖鎖が、皮膚と水晶体という非連続な存在でありながら、極めて類似していることが判明した。このことは水晶体が皮膚と同じ表皮外胚葉から発生することを考えると納得できる。

レクチンの陽性像は水晶体の上皮細胞および皮質でのみ認められ、水晶体核部ではいずれのレクチンでも陽性像を認めなかった。また、皮質においては、有核線維と無核線維では染色強度に明らかな差がみられ、無核線維は非常に弱い陽性像を示すにすぎなかった。田浦¹³⁾はウツガエルの水晶体の静止電位と入力抵抗を測定し、形態学的所見とを総合し、水晶体における正常の膜機能は水晶体の表層にのみ存在することを述べている。このことから、今回、水晶体核部が陰性であったことは、標本作成上に問題があるのでは無く、無核化することにより水晶体線維の代謝が急激に低下し、この部に糖質が乏しいことを示唆する所見と考えられた。

水晶体線維は後嚢側を基底として前嚢側に延びた、生体の中でも大きな細胞の1つである。本実験での染

色結果を見ると、前極と後極とで染色強度に差が存在し、基底側とapex側とで結合するレクチンに相違がみられ、同一水晶体線維細胞においても代謝の上で部位的相違が存在し、さらに細胞単位での極性を保持していることが推測された。

レクチンが結合する複合糖質は、一般には糖タンパク質と考えられている²⁾。糖タンパク質は血清型と粘液型に大別される。前者では糖鎖とタンパク質の結合がN-グリコシド型で、糖鎖にはマンノースが含まれるが、N-アセチルガラクトサミンは微量であるかこれを欠くものに対して、後者では糖鎖とタンパク質の結合がO-グリコシド型で、糖鎖にN-アセチルグルコサミンが含まれるが、マンノースは微量であるかこれを欠くものである¹⁴⁾。今回使用したレクチンを糖タンパク質糖鎖との結合性²⁾から考察してみると、血清型糖鎖に結合するConA, WGAのみが上皮細胞に陽性を示しており、粘液型糖鎖に結合するPNAは上皮細胞に陽性を示さなかった。このことから、血清型糖タンパク質と粘液型糖タンパク質の水晶体での分布に明らかな相違があり、糖鎖のうちN-アセチルグルコサミン、マンノースは上皮細胞から皮質にあまり分布していないが、N-アセチルガラクトサミンは水晶体皮質に偏在して存在していることが推察された。

以上のように、正常水晶体における複合糖質糖鎖が、細胞分化に伴い変化することが組織化学的に初めて明らかにすることができた。このことは、白内障における混濁の進行の部位的相違を理解する上で興味のある所見である。今後、種々の病態における水晶体糖質の変化を、生化学的な検討に加えて、レクチンによる水晶体の組織化学的所見を総合して考察することは、白内障の発生機序を知るうえで非常に重要であると思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました矢川寛一教授に深謝いたします。また、研究の機会を与えてくださいますともにご校閲を賜りました眼科学講座の田澤豊教授ならびにご校閲を賜りました生化学講座の小野繁教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第54回日本中部眼科学会で報告した。

文 献

- 1) 大沢利昭 編：細胞認識と動物レクチン。講談社、東京、1982。
- 2) 大沢利昭 編：レクチンと細胞生物学。講談社、東京、1985。
- 3) 平野 寛、高田邦昭：レクチンの組織細胞化学的

- 応用. 日本組織細胞化学会編, 学際企画, 東京, 113—132, 1983.
- 4) 山本覚次, 錦織恂子, 錦織敏治他: 水晶体線維の糖蛋白, 並びにその崩壊—concanavalin A を用いた検討—, 日眼 83: 1216—1224, 1979.
 - 5) Webster EH Jr, Uknis ME: Transient appearance of and regional differences in apical cell surface materials during early morphogenesis of the chicken lens. *Histochem J* 19: 203—209, 1987.
 - 6) Dische Z, Smirnow N, Zelmenis G: Glycoproteins of the lens in relation to age and cataract formation. I. Glycoproteins of the bovine lens fibers. *Invest Ophth* 1: 646—652, 1962.
 - 7) 高久 功: 水晶体のムコ(グライコ)蛋白に関する研究. 日眼 67: 467—469, 1963.
 - 8) Kabazawa I, Fukui HN: Glycoproteins of the cattle lens plasma membrane. *Jpn J Ophthalmol* 21: 348—354, 1977.
 - 9) 山本覚次, 津田和良, 中田敬一: 牛水晶体線維形質膜の糖蛋白について. 眼紀 32: 1831—1834, 1981.
 - 10) Ookusa Y, Takata K, Nagashima M, et al: Distribution of glycoconjugates in normal human skin using biotinyl lectins and avidin-horseradish peroxidase. *Histochemistry* 79: 1—7, 1983.
 - 12) Nemanic MK, Whitehead JS, Elias PM; Alterations in membrane sugars during differentiation. *J Histochem Biochem* 31: 887—897, 1983.
 - 13) 田浦輝美: 白内障発生機序に関する基礎的研究.
1. 正常水晶体の電気生理学的, および形態学的研究. 日眼 83: 1788—1801, 1979.
 - 14) Clamp JR: Mucus in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 89: 1—15, 1977.