

光受容体間基質のレクチン組織化学的研究

—Neuraminidase 誘発網膜剥離部の検討—

上原 文行*, 大庭 紀雄*, Douglas Yasumura**, Matthew M. LaVail**

*鹿児島大学医学部眼科学教室, **カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部解剖学及び眼科学教室

要 約

Neuraminidase を白色成熟ラット硝子体内に注入することによって網膜剥離を引き起こし、その部分の光受容体間基質 (IPM) を蛍光標識レクチンを用いて組織化学的に検索した。Peanut agglutinin (PNA) は、網膜剥離部の網膜下腔を視細胞外節と網膜色素上皮との間にのびて両者を結んでいる IPM 成分に結合した。Ricin *communis* agglutinin-1 (RCA-1) は、網膜剥離の浅い部分では外節と色素上皮との間の網膜下腔全体の IPM 成分にビマン性に一様に結合分布し、網膜剥離の強い部分ではその IPM 成分への結合が外節から色素上皮に向かうにつれて減弱した。これらの所見から、接着と輸送に関与している IPM の複合糖質はそれぞれムチン型 (PNA で認識される) と血清型 (RCA-1 で認識される) とに対応し、互いに異なった機能を分担していることが示唆された。(日眼会誌 95: 332—335, 1991)

キーワード: 光受容体間基質, レクチン, 接着, 物質輸送

Lectin Binding in the Interphotoreceptor Matrix in Neuraminidase-induced Retinal Detachment

Fumiyuki Uehara*, Norio Ohba*, Douglas Yasumura** and Matthew M. LaVail**

*Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

**Departments of Anatomy and Ophthalmology, University of California, San Francisco, School of Medicine

Abstract

Binding sites of fluorescence isocyanate-labeled lectins, peanut agglutinin (PNA) and *Ricinus communis* agglutinin-1 (RCA-1), were studied in the interphotoreceptor matrix (IPM) of adult rat retinas that were pretreated with an intravitreal injection of neuraminidase. The localization of binding sites to the subretinal IPM differed significantly between the two lectins. PNA bound to the subretinal IPM components in a cord-like fashion that formed a bridge between the apical photoreceptor outer segments and the surface of the RPE. On the other hand, RCA-1 showed homogeneously prominent binding to the subretinal space IPM, the intensity of which appeared to inversely correlate with the extent of neuraminidase-induced retinal separation. The results suggest that the IPM may consist of mucin-type glycoconjugates as recognized by PNA and serum-type ones as bound by RCA-1, and that these IPM components may play different roles in the maintenance and organization of photoreceptor-RPE complex, e.g. the mucin-type for the retinal adhesion and the serum-type for the transport of metabolites. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 332—335, 1991)

Key words: Interphotoreceptor matrix, Lectin, Adhesion, Transport of metabolites

別刷請求先: 890 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 2 年 8 月 24 日受付, 平成 2 年 9 月 14 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 890, Japan

(Received August 24, 1990 and accepted in revised form September 14, 1990)

I 緒 言

光受容体間基質(Interphotoreceptor matrix, IPM)は、網膜色素上皮と視細胞外節、内節周囲の網膜下腔を満たし、種々の重要な機能を有している^{1)~7)}。IPMは様々な成分で構成されるが、現在までに識別されている代表的なものに以下がある。1) 光受容体間レチノール結合蛋白(Interphotoreceptor retinol-binding protein: IRBP): ビタミンAの輸送に関与するとみなされる³⁾⁴⁾。2) 錐体視細胞周囲IPM: ピーナッツレクチン[peanut agglutinin (PNA)]によって特異的に認識される^{5)~7)}。3) 杆体視細胞周囲IPM: 小麦胚芽レクチン[wheat germ agglutinin (WGA)]によって特異的に認識される⁵⁾⁷⁾。これらは、いずれも複合糖質である。だが、それぞれのIPM成分の機能の分担、重複については今一つ明確でない。

ところでneuraminidaseを眼球内に注入すると神経網膜と色素上皮細胞の間の接着力が弱くなるという報告⁸⁾がみられる。今回筆者らは、neuraminidaseをラット硝子体内に注入することによって網膜剥離を引き起こし、その部分をレクチン組織化学的に検索したところ、IPMの接着と輸送に関与している複合糖質はそれぞれムチン型と血清型とに対応し、互いに異なった機能を分担していることを示唆する知見を得たので報告する。

II 実験方法

白色成熟ラット(RCS-*rdy*⁺, 8~10週齢)を12時間(明):12時間(暗)の光周期下に飼育した。暗順応2~3時間後(午前9~10時に)、ketamine (87mg/kg)とxylazine (13mg/kg)を混合筋肉注射して全身麻酔した。Neuraminidase(*Clostridium perfringens*, Type V; Sigma Chemical Co., U.S.A.)をDulbecco's phosphate buffered saline (PBS)に1mg/ml (2U/ml)の濃度に溶解した液を、1眼につき5 μ lずつ先に報告した方法⁹⁾で5匹(10眼)のラット硝子体内に注入した。6時間後に炭酸ガス吸引により安楽死させ、ただちに2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.3, 37°C)を用いて蛍光灯下で灌流固定した。眼窩内容除去術を行い、摘出眼球をさらに同固定液を用いて一晚浸潤固定、水洗、methanol-methylcellosolveを用いて脱水、polyester waxに包埋した。8 μ mの組織切片を作成し、蛍光標識レクチン[PNAあるいは*Ricinus communis*

agglutinin-1 (RCA-1); E-Y Laboratories, U.S.A.]の1mg/ml PBS溶解液を30~50分間浸潤させた。コントロールとしては、レクチンとハプテン糖(0.2M D-galactose)の混合液を同様に浸潤させ、レクチン単独液の染色像よりも染色度が減弱していた場合にその染色部位をレクチン反応部位と判定した。蛍光顕微鏡(青励起)下に網膜剥離部のIPMのレクチン染色性、網膜下腔内分布様式について観察した。

III 結 果

Neuraminidase注入眼の半数以上(10眼中6眼)に網膜剥離が観察された。その部分のレクチン染色像について以下に記載した。

蛍光標識-PNA染色像: 視細胞外節全体、および網膜色素上皮細胞突起の表面(IPM)が強くビマン性に染色された。そして、ところどころ両者の間に橋をかけるように、IPM成分が網膜剥離部と接着部の境界領域の網膜下腔内を紐状に伸展している染色像が検出された(図1a, b: 矢印)。このようなIPM伸展部以外では色素上皮表面と外節先端の間の網膜下腔内IPM成分は染色されなかった。一方、外境界膜が中等度に、内節の表面が弱く染色された。

蛍光標識-RCA-1染色像: 網膜剥離の浅い部分では、色素上皮表面と外節先端の間の剥離部網膜下腔内IPM成分がビマン性に一様に染色された。また、外節と内節の境界部および内境界面が中等度に、外節と内節の表面が弱く染色された(図1c)。網膜剥離の強い部分では、剥離部網膜下腔内において視細胞外節から色素上皮に向かうにつれてIPM成分の染色性が減弱していく所見が観察された(図1d)。

これらの染色蛍光所見は、ハプテン糖の存在下でその強さが減弱することからPNAあるいはRCA-1が特異的に結合したものと判定した。なお、これらのレクチンの結合が細胞表面に局限したものか、どれ位の範囲(厚さ)にわたって細胞間隙(外節-外節間、内節-内節間)に分布しているのか光顕的には判別できなかった。広義のIPMとして解釈、記載した。

IV 考 按

通常PNAは錐体の外節、内節およびその周囲のIPMに選択的に結合する^{5)~7)10)11)}。だが、組織切片をneuraminidaseで処理した場合、杆体の外節、内節およびその周囲のIPMにも結合するようになる¹²⁾。今回の実験では、PNAは錐体に局限することなく視細胞

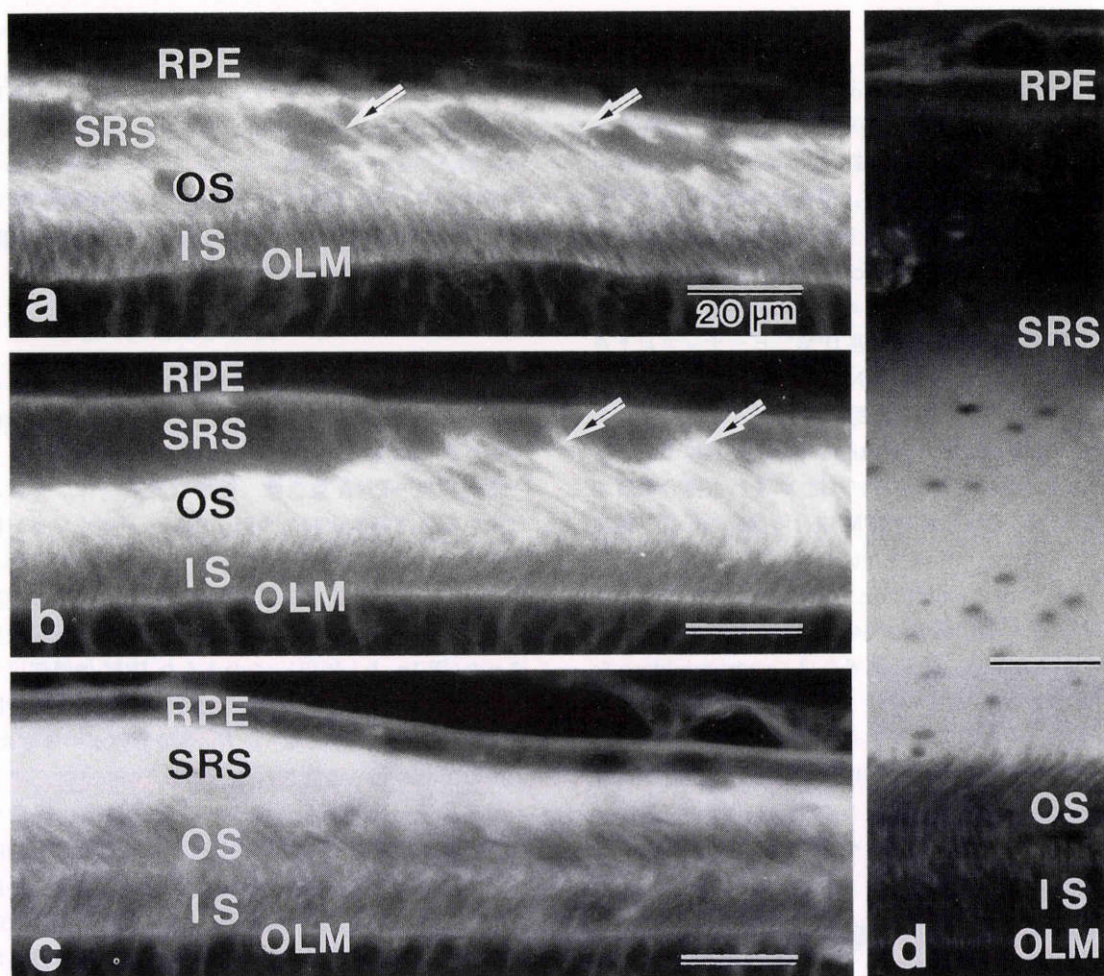


図1 網膜剥離部光受容体間基質 (IPM) の光顕レクチン染色像 (×750)

a, b: 蛍光標識 PNA 染色. IPM 成分が剥離部網膜下腔内を紐状に伸展し, 視細胞外節と色素上皮細胞とを結んでいるのが染色されている (矢印). c, d: 蛍光標識 RCA-1 染色. 剥離部網膜下腔内 IPM がビマン性に (c) あるいは視細胞外節から色素上皮細胞に向かうにつれて次第に弱く (d) 染色されている.

RPE: 網膜色素上皮細胞, SRS: 剥離部網膜下腔, OS: 視細胞外節, IS: 視細胞内節, OLM: 外境界膜

全体およびその周囲に結合分布するのが観察された. このことは neuraminidase が硝子体内注入後 6 時間以内に網膜下腔に到達作用したことを示している. また neuraminidase 注入によって網膜接着力が弱くなった⁸⁾ために網膜剥離が引き起こされたものと考えられる.

IPM 複合糖質の PNA と RCA-1 とで認識される成分の異同について二次元電気泳動的に解析すると, 互いに異なる位置に泳動される成分が多い¹³⁾. このこと

に関連して今回の実験での興味ある所見は, 剥離した網膜下腔内 IPM の PNA 染色像と RCA-1 染色像とが, 明らかに異なっていたことである. 即ち, PNA 結合 IPM 成分が網膜剥離部と接着部の境界領域の網膜下腔を視細胞外節から色素上皮の方へのびて両者を結んでいるのに対し, RCA-1 は網膜剥離の浅い部分では網膜下腔全体にビマン性に一樣に結合分布し, 網膜剥離の強い部分ではその結合が視細胞外節から色素上皮に向かうにつれて減弱していく像が観察された. これ

はPNAで認識されるIPM成分は先に電顕的にも示された⁷⁾ように視細胞外節と色素上皮細胞の間の接着に関与しているであろうことを、RCA-1で認識されるIPM成分は恐らく視細胞の方で産生され色素上皮の方へ向かって拡散していくであろうことを示唆している。筆者らはIPM成分の分布が明暗で変化すること¹⁴⁾、さらに明暗とともに変化するのは主としてRCA-1結合成分である¹⁵⁾ことを最近発見した。このことと、今回の網膜下腔内IPM RCA-1染色像とをあわせて考察すると、RCA-1で認識される型のIPM複合糖質は通常遊離の状態が存在し、明暗でその分布を変えることによって視細胞外節と色素上皮の間を移動するのであろう。そして、両細胞間を移動しつつビタミンAの運搬を行っていると思われるIRBPは、その糖鎖末端のシアル酸を除去するとRCA-1に認識される⁴⁾と報告されている。筆者らが今回レクチン組織化学的に同定したRCA-1結合成分の一つにはIRBPが含まれると考えられる。

一般にPNAで認識される複合糖質はムチン型、RCA-1で認識されるのは血清型と別称されているが、IPM複合糖質も網膜下腔内においてその別称の表すような機能をそれぞれ有しているものと推定される。即ち、PNA結合成分はムチンと同じように粘着(接着)や細胞保護の機能を、RCA-1結合成分は血清と同様に必須物質運搬の機能をそれぞれ果たしているものと考えられる。したがって、IPM複合糖質をこのように大きく2つに分類して今後の研究を進めることは意義があるであろう。

文 献

- 1) LaVail MM, Pinto LH, Yasumura D: The interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 658—668, 1981.
- 2) Adler AJ, Evans CD: Proteins of the bovine interphotoreceptor matrix: Retinoid binding and other functions. In Bridges CD, Adler AJ (ed): *The Interphotoreceptor Matrix in Health and Disease*, New York, Alan R Liss Inc, 65—88, 1985.
- 3) Lai Y-L, Wiggert B, Liu YP, et al: Interphotoreceptor retinol-binding protein: Possible transport vehicle between compartments of the retina. *Nature* 298: 848—849, 1982.
- 4) Fong S-L, Liou GI, Bridges CD, et al: Purification and characterization of a retinol-binding glycoprotein synthesized and secreted by bovine neural retina. *J Biol Chem* 259: 6534—6542, 1984.
- 5) Uehara F, Sameshima M, Ohba N, et al: Affinity isolation of cone outer segment using a peanut agglutinin-nitrocellulose sheet. *Exp Eye Res* 43: 687—693, 1986.
- 6) Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC: Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 129—135, 1986.
- 7) Sameshima M, Uehara F, Ohba N: Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. *Exp Eye Res* 45: 845—863, 1987.
- 8) Yao X-Y, Marmor MF: Interphotoreceptor matrix plays an important role in retinal adhesiveness. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 30: 240, 1989.
- 9) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, et al: Nucleotide-induced retinal changes, In LaVail MM, Anderson RE, Hollyfield JG (ed): *Inherited and Environmentally Induced Retinal Degenerations*, New York, Alan R Liss, 577—584, 1989.
- 10) 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.
- 11) Blanks JC, Johnson LV: Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells: A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 546—557, 1984.
- 12) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N, et al: Effects of neuraminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. *Jpn J Ophthalmol* 29: 54—62, 1985.
- 13) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors in the bovine interphotoreceptor matrix. *Exp Eye Res* 43: 227—234, 1986.
- 14) Uehara F, Matthes MT, Yasumura D, et al: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science* 248: 1633—1636, 1990.
- 15) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM: Rod- and cone-associated interphotoreceptor matrix in the rat retina: Differences in light-evoked distributional changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* in press (1991).