

## 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

上原 文行, 鮫島 宗文, 鶴木 一彦, 大久保明子  
柳田 豊子, 菅田 昌則, 岩切 直人, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

### 要 約

O-結合型糖鎖である Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基とシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基を特異的に認識して結合する amaranthin のヒト網膜における結合分布について, ABC 法を用いて組織化学的に検索した. Amaranthin は, 視細胞層, 内網状層, 神経節細胞層および神経線維層に結合した. 視細胞層に関しては, 錐体, 杆体ともに, 外節および内節の表面に結合した. Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基だけを認識する peanut agglutinin は, 錐

体表面だけに結合することから, 錐体および杆体周囲にはともに O-結合型複合糖質が分布し, その糖鎖の非還元末端は, 錐体周囲で Gal  $\beta$  1,3 GalNAc であるのに対し, 杆体周囲ではシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc であると結論される. (日眼会誌 99: 286-288, 1995)

キーワード: 網膜視細胞, Amaranthin, レクチン, O-結合型複合糖質

### Binding of Amaranthin in Human Retina

Fumiyuki Uehara, Munefumi Sameshima, Kazuhiko Unoki,  
Akiko Okubo, Toyoko Yanagita, Masanori Sugata,  
Naoto Iwakiri and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

### Abstract

The binding of amaranthin, specific for Gal  $\beta$  1,3 GalNAc and sialic acid Gal  $\beta$  1,3 GalNAc sequences, to the human retina was investigated with avidin-biotinylated peroxidase. Amaranthin bound to the cone and rod photoreceptors, inner plexiform layer, ganglion cells, and nerve fibers. Since peanut agglutinin, specific for Gal  $\beta$  1,3 GalNAc, selectively binds to cones, we conclude that O-glycoside-linked

glycoconjugates are present on the surfaces of both cones and rods: Gal  $\beta$  1,3 GalNAc and sialic acid Gal  $\beta$  1,3 GalNAc are terminal sugars of the glycoconjugates around cones and rods, respectively. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 286-288, 1995)

Key words: Photoreceptors, Amaranthin, Lectin, O-linked glycoconjugates

### I 緒 言

レクチンは糖鎖構造を認識して結合する性質を有し, 複合糖質の研究に広く用いられている. Peanut agglutinin (PNA) は, Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基を認識し<sup>1)</sup>, 正常網膜においては, 錐体視細胞表面<sup>2)3)</sup>および錐体周囲の光受容体間基質 (IPM)<sup>4)~6)</sup>に選択的に結合する. 組織切片をレクチン染色に先行して neuraminidase 処理すると, PNA は杆体視細胞の表面にも結合するようにな

る<sup>7)~11)</sup>. PNA の結合は, 糖鎖末端にシアル酸が存在すると阻害されることから, 杆体周囲にも Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基を有する O-結合型の複合糖質が分布しているのがあるが, 通常はその糖鎖末端にシアル酸が存在することによって, PNA で染色されないのではないかと考えられる. このことは, 最初に著者らのグループによって提案され, 他のグループによっても同様に考えられている<sup>7)~11)</sup>. しかしながら, 組織切片を neuraminidase 処理した場合, neuraminidase が杆体を含む組織切片に結合

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 6 年 8 月 15 日受付, 平成 6 年 9 月 29 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 August 15, 1994 and accepted September 29, 1994)

し、その neuraminidase に PNA が結合することによって、杆体も PNA で染色されるようになるのではないかと、という考え方が Johnson ら<sup>12)</sup>のグループによって示された。Neuraminidase を組織化学的研究に使用する限りにおいては、常にこのような可能性は除外できないことから、どちらの考え方が正しいのか今日に至るまで明確にされないままになっていた。

ところで、最近、糖鎖末端のシアル酸の有無にかかわらず、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基を認識して結合するレクチンである amaranthin<sup>13)</sup>と jacalin<sup>14)</sup>が発見され、組織化学的研究に使用されるようになってきた。もし、これらのレクチンが杆体周囲にも結合することが確認できれば、そこに Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基を有する O-結合型の複合糖質が分布していることの証明になるであろう。この点に関して明確にしておくことは、視細胞におけるシアル酸の生理学的意義を検討する上で重要であると考えられる。そこで、jacalin よりもさらに特異性の限定された amaranthin<sup>13)</sup>の、ヒト網膜視細胞結合分布について組織化学的に検索した。

## II 実験方法

眼瞼扁平上皮癌の眼窩内浸潤のために眼窩内容除去術を施行した1例、および脈絡膜悪性黒色腫のために眼球摘出した2例、合計3眼から得た網膜を試料としてレクチン組織化学的検索を下記の方法で実施した。すなわち、

摘出眼球を4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde/磷酸緩衝液(PBS), pH 7.4 を用いて浸漬固定、アルコール脱水、パラフィン包埋した。8  $\mu$ m の組織切片を作成、脱パラフィンし、内因性 peroxidase 活性を0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で、レクチンの非特異的吸着を2% 牛血清アルブミンで抑制した後、ビオチン標識した amaranthin (10  $\mu$ g/ml PBS) を1時間反応させた。対照としては、0.2 M ガラクトースを含む amaranthin 溶解液を同様に反応させた。次に、Vectastain Elite ABC Kit と diaminobenzidine を用いて発色させた。腫瘍部と健常部の観察を同時に行ったが、今回の研究報告は、正常網膜視細胞のO-結合型複合糖質分布の同定を目的としていることから、健常部網膜のレクチン結合性についてのみ報告する。

## III 結果

3例とも、後極部から周辺部網膜に至るまで、基本的には同じ amaranthin 染色像を示した。すなわち、視細胞層、内網状層、神経節細胞層、および神経線維層が染色された。眼窩内容除去術を施行した眼瞼腫瘍の症例は全範囲にわたって網膜が保存されていたが、錐体視細胞だけでなく杆体視細胞の割合も多く、両者が形態学的に容易に区別できる赤道部の網膜の amaranthin 染色像について、図1に示した。視細胞層に関しては、錐体(基部が太く先端部になっている)、杆体(基部から先端部に

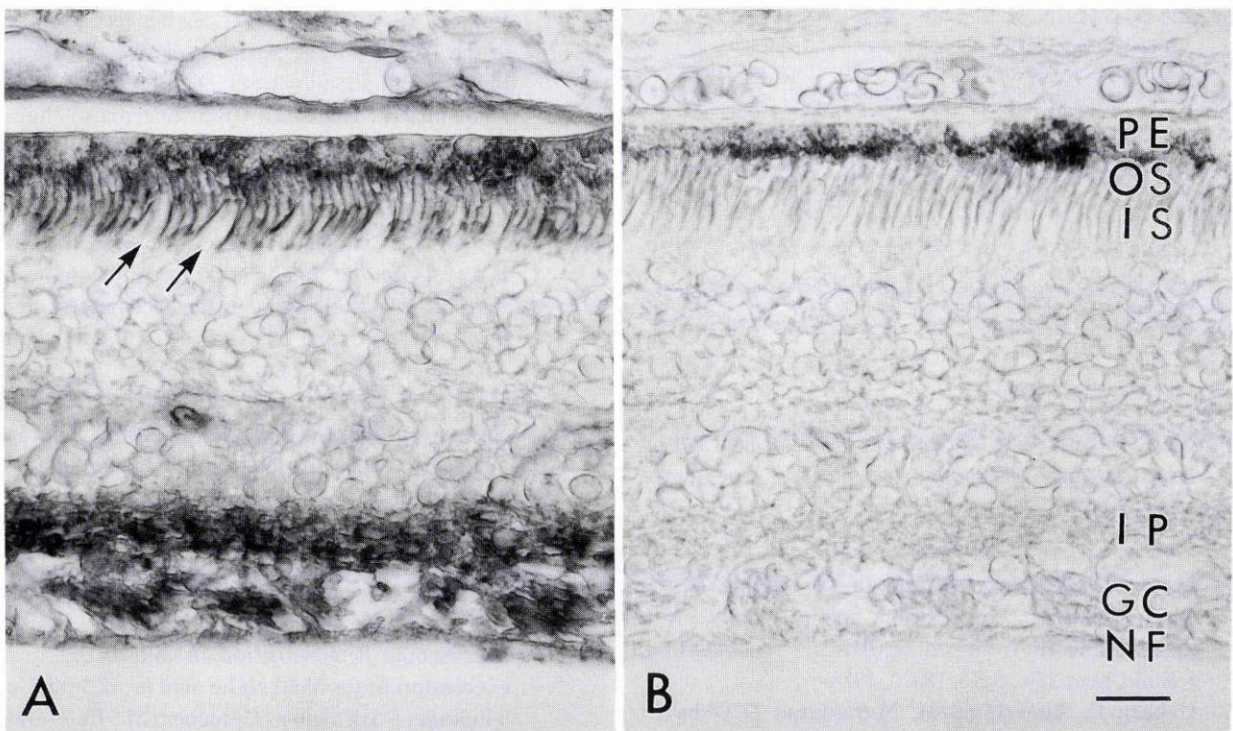


図1 ヒト網膜のビオチン標識 amaranthin 染色像。

A: Amaranthin は、錐体(矢印)・杆体視細胞の外節(OS)・内節(IS)の表面、内網状層(IP)、神経節細胞層(GC)、および神経線維層(NF)を染色している。B: ガラクトースを溶解させた amaranthin は、網膜のどの層も染色していない。網膜色素上皮細胞(PE)のメラニン色素だけが黒く見える。バーは20  $\mu$ m

至るまで細長い) ともに外節および内節の表面が強く染色されている(図1A)。ハブテン糖であるガラクトースを混合した amaranthin 溶解液を反応させた対照切片は、網膜全層にわたってほとんど染色されず、網膜色素上皮細胞のメラニン色素だけが茶褐色に観察された(図1B)。したがって、上記の視細胞層、内網状層、神経節細胞層、および神経線維層には、特異的に amaranthin が結合したものと判定した。色素上皮細胞表面への結合の有無については、色素上皮細胞内に分布するメラニン色素に覆われているために判別できなかった。

#### IV 考 按

Amaranthin は Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基とシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基の両者を特異的に認識して結合する<sup>13)</sup>。今回の実験から、amaranthin は錐体表面だけでなく、杆体表面にも結合することが明らかになった。Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基だけを認識する PNA<sup>11)</sup> は、杆体表面にはほとんど結合しない<sup>7)~11)</sup> ことから、amaranthin は杆体表面には、その周囲に存在するシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基残基を認識して結合するものとみなされる。著者らは、シアル酸  $\alpha$  2,3 Gal を特異的に認識する *Maackia amurensis* レクチン<sup>15)</sup> が、杆体周囲に結合することも観察している。これらの結果から、錐体および杆体周囲にはともに O-結合型複合糖質が分布しているのであるが、その糖鎖の非還元末端は、錐体周囲で Gal  $\beta$  1,3 GalNAc であるのに対し、杆体周囲ではシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal  $\beta$  1,3 GalNAc であると結論づけることができる。

以上から、組織切片をレクチン染色に先行して neuraminidase 処理することによって、PNA が錐体周囲だけでなく、杆体周囲にも結合するようになるのは、通常、桿体周囲に存在する Gal  $\beta$  1,3 GalNAc 残基の糖鎖末端にシアル酸が存在するためである、という著者らの考え方<sup>7)~11)</sup> が証明された。錐体と杆体周囲の糖鎖末端構造の違いの生理学的意義については、先に詳細に考察する機会を得た<sup>16)</sup> が、今後ともさらに種々の網膜疾患の病態とも関連させた研究を進めていく必要がある。

本研究には文部省科学研究費補助金(一般研究 C05671470)、平成5年度日本医師会研究助成費の援助を受けたことを付記して謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113—123, 1983.

- 3) Blanks JC, Johnson LV: Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 546—557, 1984.
- 4) Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC: Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 129—135, 1986.
- 5) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Affinity isolation of cone outer segment using a peanut agglutinin-nitrocellulose sheet. *Exp Eye Res* 43: 687—693, 1986.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kivelä T, Tarkkanen A: A lectin cytochemical study of glycoconjugates in the human retina. *Cell Tissue Res* 249: 277—288, 1987.
- 9) Molday LL, Molday RS: Glycoproteins specific for the retinal rod outer segment plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 897: 335—340, 1987.
- 10) Cohen D, Nir I: Cytochemical characterization of sialoglycoconjugates on rat photoreceptor cell surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 640—645, 1987.
- 11) Polans AS, Burton MD: Sialoglycoconjugates of the frog rod outer segment plasma membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1523—1532, 1988.
- 12) Johnson LV, Hageman GS: Enzymatic characterization of peanut agglutinin binding components in the retinal interphotoreceptor matrix. *Exp Eye Res* 44: 553—565, 1987.
- 13) Rinderle SJ, Goldstein IJ, Matta KL, Ratcliffe RM: Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T-(or cryptic T)-antigen. *J Biol Chem* 264: 16123—16131, 1989.
- 14) Hortin GL, Trimpe BL: Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of Jacalin-agarose. *Anal Biochem* 188: 271—277, 1990.
- 15) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu5Ac ( $\alpha$ 2,3) Gal ( $\beta$ 1,4) GlcNAc sequence with the leucoagglutinin from *Maackia amurensis*: Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-linkage. *J Histochem Cytochem* 37: 1577—1588, 1989.
- 16) 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.