

ラット虹彩・毛様体の  $\alpha$  2,3-sialyltransferase mRNA の分布上原 文行<sup>1)</sup>, 大庭 紀雄<sup>1)</sup>, 鮫島 宗文<sup>1)</sup>, 鶴木 一彦<sup>1)</sup>, 大久保明子<sup>1)</sup>柳田 豊子<sup>1)</sup>, 菅田 昌則<sup>1)</sup>, 岩切 直人<sup>1)</sup>, 小澤 政之<sup>2)</sup><sup>1)</sup>鹿児島大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>鹿児島大学医学部第二生化学教室

## 要 約

ラット虹彩・毛様体における, O-結合型の糖鎖にシアル酸を付加する酵素である  $\alpha$  2,3-sialyltransferase ( $\alpha$  2,3-ST) の mRNA の発現分布について, *in situ* hybridization 組織化学的手法を用いて検索した. 毛様体無色素上皮細胞に強度の, 虹彩色素上皮細胞に軽度の  $\alpha$  2,3-ST の mRNA の発現像が観察された. シアル酸を含有する複合糖質の合成は, その糖鎖の非還元末端に sialyltransferase の作用によってシアル酸が付加されることによって終了することから, この酵素の発現部位

では, シアル酸を含有する複合糖質が産生されているものとみなされる. したがって, 過去の組織化学的研究で同定された, 毛様体無色素上皮細胞に豊富に分布するシアル酸を含有する複合糖質は, 毛様体無色素上皮細胞自身で多量に産生される複合糖質に由来するものであると結論される. (日眼会誌 99: 397-399, 1995)

キーワード: 虹彩, 毛様体,  $\alpha$  2,3-sialyltransferase, mRNA, 複合糖質

Distribution of  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferase mRNA in Rat Iris and Ciliary BodyFumiyuki Uehara<sup>1)</sup>, Norio Ohba<sup>1)</sup>, Munefumi Sameshima<sup>1)</sup>, Kazuhiko Unoki<sup>1)</sup>, Akiko Okubo<sup>1)</sup>, Toyoko Yanagita<sup>1)</sup>, Masanori Sugata<sup>1)</sup>, Naoto Iwakiri<sup>1)</sup> and Masayuki Ozawa<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine<sup>2)</sup>Biochemistry, Kagoshima University Faculty of Medicine

## Abstract

The distribution of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase ( $\alpha$ 2,3-ST) mRNA in the rat iris and ciliary body was investigated with *in situ* hybridization histochemistry. Strong expression of  $\alpha$ 2,3-ST mRNA was detected in the inner epithelial layer of the ciliary body and weak expression in the iris epithelium. Since the synthesis of sialoglycoconjugates is completed by terminal sialylation by the action of sialyltransferase (ST), the ST-expressed portions

are considered to produce sialoglycoconjugates. Hence, the source of the sialoglycoconjugates found in the inner epithelial layer of the ciliary body in previous histochemical studies is the same epithelial cell. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 397-399, 1995)

Key words: Iris, Ciliary body,  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase, mRNA, Glycoconjugates

## I 緒 言

複合糖質は, 糖を側鎖にもつ蛋白あるいは脂質で, 種々の細胞間相互作用の発現に関与<sup>1)</sup>, 虹彩および毛様体の上皮にも分布していることがレクチン組織化学やオートラジオグラフィーを用いた研究によって明らかにされている<sup>2)3)</sup>. また, 毛様体無色素性上皮細胞は, 硝子体中

へも複合糖質を分泌していると報告<sup>4)</sup>されている. ところで, 組織化学的手法を用いた場合, 目標とする複合糖質が分布している部位は同定できるが, それが必ずしもその部位で産生されたものとは限らない. オートラジオグラフィーを用いた検索でも, 目標とする複合糖質が単にその部位を通過している像をとらただけの可能性はある. すなわち, いずれの手法を用いた場合にも, その

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11月15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-shi Kagoshima-ken 890, Japan

(Received August 15, 1994 and accepted in revised form November 15, 1994)

産生細胞を確定することはできない。それに対し, in situ hybridization 組織化学的手法を用いると, 目的とする物質を実際に産生している細胞を同定することができる<sup>5)</sup>。

シアル酸を含有する複合糖質の合成は, その糖鎖の非還元末端に sialyltransferase の作用によってシアル酸が付加されることによって終了する<sup>6)</sup>。したがって, sialyltransferase の mRNA を発現している部位では, シアル酸を含有する複合糖質が実際に産生されているものとみなすことができる。そこで, ラットの虹彩, 毛様

体において, シアル酸を含有する複合糖質を産生している部位を明らかにするべく, in situ hybridization 組織化学的手法を用いて, O-結合型の糖鎖であるガラクトース  $\beta$  1,3 N-アセチルガラクトサミンにシアル酸を付加する  $\alpha$  2,3-sialyltransferase ( $\alpha$  2,3-ST) の mRNA<sup>7)</sup> の発現分布について検索した。

## II 実験方法

先に報告した in situ hybridization 組織化学の方法<sup>5)</sup> に準じて, プタの肝臓から mRNA を精製, 逆転写酵素を

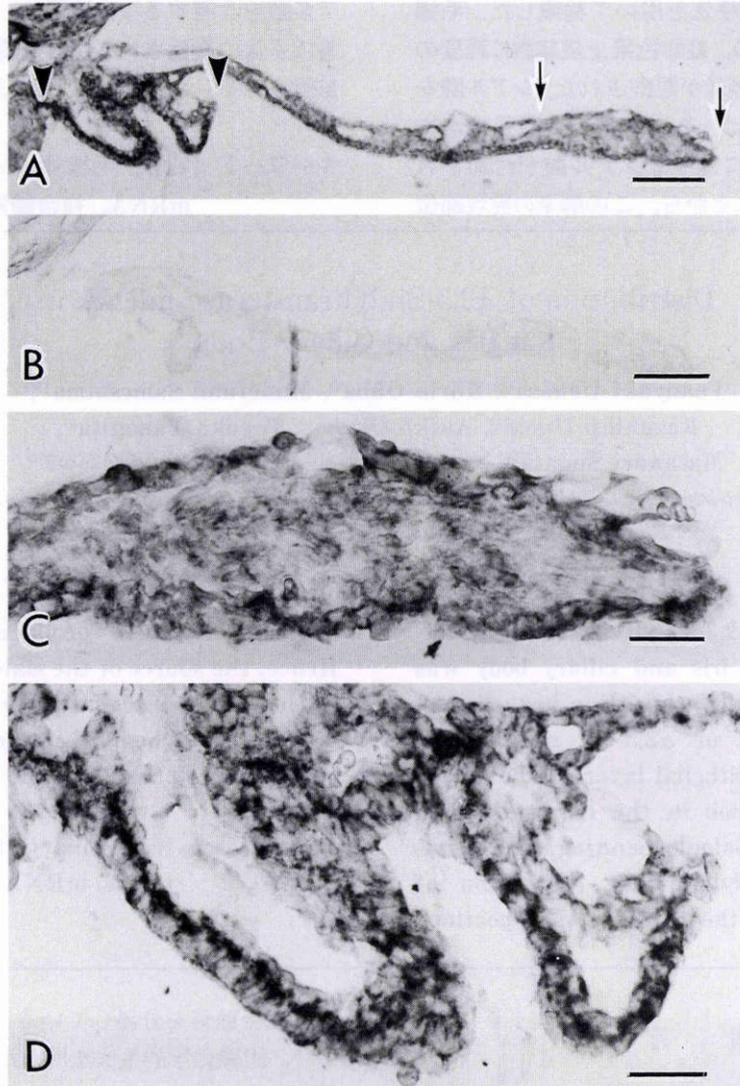


図1 ラット虹彩・毛様体の digoxigenin 標識 RNA プローブのハイブリダイズ像。

A:  $\alpha$  2,3-sialyltransferase ( $\alpha$  2,3-ST) の antisense プローブのハイブリダイズ像。毛様体には, その上皮と考えられる部分にびまん性のシグナルが観察される。虹彩の上皮と考えられる部分には, 散在性のシグナルが観察される。バーは 100  $\mu$ m

B:  $\alpha$  2,3-ST の sense プローブのハイブリダイズ像。虹彩・毛様体とも, 全体的に微弱なシグナルしか観察されない。バーは 100  $\mu$ m

C:  $\alpha$  2,3-ST の antisense プローブのハイブリダイズ像(A の 2 つの矢印ではさまれた虹彩先端部の強拡大像)。虹彩色素上皮細胞の細胞質に, 散在性にシグナルが観察される。バーは 25  $\mu$ m

D: 毛様体部の  $\alpha$  2,3-ST の antisense プローブのハイブリダイズ像 (A の 2 つの矢印ではさまれた毛様体部の強拡大像)。毛様体無色素上皮細胞の色素上皮細胞側の細胞質に強度の, 基底側(硝子体側)の細胞質に軽度のシグナルが観察される。バーは 25  $\mu$ m

用いてc-DNAを合成し、 $\alpha$  2,3-STのcDNA<sup>7)</sup>の塩基配列に特異的なプライマー(5'-GCTCGTCCGTTAGGCG-TG-3'; 5'-TGAGGCTGGGCCACCAAG-3')を用いてPCRを行い、そのcDNAを選択的に増幅、分離した。さらに、そのcDNAをプラスミッドのBluescript SK(+ )に組み込みクローニングし、T3 RNA polymeraseを用いてantisenseのRNAプローブを、T7 RNA polymeraseを用いてsenseのRNAプローブを合成し、同時にdigoxigenin標識した。

白色Wistarラット(生後6週齢)を4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde/燐酸緩衝液, pH 7.4 (PBS)を用いて灌流固定し、眼球を摘出した。眼球を同固定液を用いてさらに一晚、浸漬固定した後、アルコール脱水、パラフィン包埋し、8 $\mu$ mの組織切片を作成した。組織切片を脱パラフィンし、proteinase K (0.68 U/ml PBS)を用いて37°Cで40分間消化した後、 $\alpha$  2,3-STのantisenseあるいはsenseのRNAプローブを、45°Cで36時間ハイブリダイズさせた。次に、非特異的に吸着したプローブを洗い流した後、アルカリフォスファターゼ標識したdigoxigeninに対する抗体を室温で2時間反応させ、最後にアルカリフォスファターゼの発色反応を行った。

### III 結 果

まず、光学顕微鏡の弱拡大の観察で、虹彩上皮部に散在性に、毛様体上皮部にびまん性に、 $\alpha$  2,3-STのantisenseプローブがハイブリダイズしている像が同定された(図1A)。 $\alpha$  2,3-STのsenseプローブを用いた場合、虹彩・毛様体とも、全体的にほとんど微弱なシグナル像しか観察されなかった(図1B)。強拡大の観察では、虹彩色素上皮細胞の細胞質に、散在性に $\alpha$  2,3-STのantisenseプローブのハイブリダイズしているシグナルが同定された(図1C)。また、毛様体無色素上皮細胞の色素上皮細胞側の細胞質に強度の、基底側(硝子体側)の細胞質に軽度の、 $\alpha$  2,3-STのantisenseプローブのハイブリダイズしているシグナルが同定された(図1D)。Antisenseプローブのハイブリダイズのシグナル(図1A, C, D)は、senseプローブのハイブリダイズのシグナル(図1B)と比較してはるかに強かったことから、これらの信号が検出された上皮細胞に $\alpha$  2,3-STのmRNAが分布しているものと判定された。

### IV 考 按

Haddadら<sup>4)</sup>は、家兎の硝子体中の複合糖質は、毛様体無色素上皮細胞によって分泌されると報告している。著者ら<sup>3)</sup>もサルを用いて、虹彩色素上皮細胞よりも毛様体無色素上皮細胞の基底側に、O-結合型、N-結合型複合糖質ともに豊富に分布していることを報告した。今回、ラットの毛様体無色素上皮細胞に強度の、虹彩色素上皮細胞に軽度の $\alpha$  2,3-STのmRNAの発現像が観察されたことは、シアル酸を含有するO-結合型複合糖質が前者で多量に、後者で少量産生されることを示している。過去の組織化学的研究で同定された、毛様体無色素上皮に豊富に分布する複合糖質は、今回の結果から、毛様体無色素上皮細胞自身で多量に産生される複合糖質に由来するものであることが明確になった。この複合糖質は、硝子体中へも分泌されるのかも知れない。シアル酸を含有する複合糖質は、網膜色素上皮細胞と視細胞との間の相互作用に関して報告<sup>5)</sup>されているのと同様に、毛様体無色素上皮細胞による貪食、毛様体無色素上皮細胞と硝子体膜との接着などの生理学的役割に関与している可能性がある。

本研究には文部省科学研究費補助金(一般研究C 05671470)の援助を受けたことを付記して謝意を表します。

### 文 献

- 1) 斎藤政樹: 糖鎖は増殖と分化をコントロールする。永井克孝(編): 糖鎖I. 糖鎖と生命。東京化学同人、東京、3-9, 1994。
- 2) Haddad A, Laicine EM, Fife RS, Jordao A, Pelletier G: Autoradiographic, electrophoretic, and immunocytochemical studies of glycoproteins of the rabbit iris. *Exp Eye Res* 53: 615-622, 1991。
- 3) 上原文行, 鮫島宗文, 鷺木一彦, 内匠勝秀, 大庭紀雄: 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。日眼会誌 92: 112-114, 1988。
- 4) Haddad A, de Almeida JC, Laicine EM, Fife RS, Pelletier G: The origin of the intrinsic glycoproteins of the rabbit vitreous body: An immunohistochemical and autoradiographic study. *Exp Eye Res* 50: 555-561, 1990。
- 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) Paulson JC, Weinstein J, Schauer A: Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* 264: 10931-10934, 1989。
- 7) Gillespie W, Kelm S, Paulson JC: Cloning and expression of the Gal  $\beta$ 1,3 GalNAc $\alpha$ 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem* 267: 21004-21010, 1992。