モルモット血管条の機能とレクチンリセプター†

西山 正 司¹⁾・瀬 口 春 道²⁾・Eva Garcia²⁾

緒 言

レクチンとは特定の糖と特異的に結合する蛋白あるいは糖蛋白で、免疫学的産物でなく、糖結合部位を2つ以上有し、その活性が単糖やオリゴ糖など簡単な糖で阻害されるものと定義されている¹⁾。細胞や組織に存在する複合糖質は細胞の分裂や分化の調節、自己非自己の認識、物質の輸送、リセプター関与による細胞の活性化など多くの機能を持っており、レクチンにより、これら糖鎖の分析が可能である²⁾³⁾。内耳におけるレクチンを用いた研究はまだ十分ではなく、コルチ器^{4)~7)}、前庭^{8)~10)}、内リンパ嚢⁹⁾、血管条¹¹⁾などで散見される程度である。血管条は、内リンパのイオン組成の維持調節に深く関与していると考えられるが¹²⁾¹³⁾、その機構には不明な点が多い。血管条が内リンパの吸収産生に、どの様に関与し

ているか明らかにする目的で、血管条におけるレクチンの結合部位を Soybean agglutinin (SBA), Helix pomatia agglutinin (HPA), Ricinus communis agglutinin-II (RCA-II), Limax flavus agglutinin (LFA), Wheat germ agglutinin (WGA) の5種類のレクチンを用い、Lowicryl K4M に包埋した超薄切片で、colloidal gold を標識とし、電子顕微鏡的に明らかにした。尚、今回は、内リンパ液の吸収、産生に関与していると考えられる辺縁細胞の腔側形質膜、核上部小胞、基底陥入部、血管内皮の基底膜を中心に観察を行った。

方 法

ブライエル反射正常の白色モルモット (体重 300~400 g) を用いた。麻酔下に心臓より 0.1 M カコジル酸緩衝 (pH 7.4) 1% グルタルアルデヒド液で約10分間

表1 使用したレクチンとその糖結合特異性、結合阻害糖、反応様式を示す。

レクチン (反応濃度)	SBA (43.0 μg/ml)	HPA (3.0 μg/ml)	RCA-Ⅱ (2.5 μg/ml)	LFA (100.0 μg/ml)	WGA (0.7 μg/ml)
糖結合特異性	α-D-Gal-NAc >β-D-Gal-NAc ≫α-D-Gal	α-D-Gal-NAc >α-D-Glc-NAc ≫α-D-Gal	β-D-Gal. Gal-NAc	NANA >NGNA*	β-D-Glc-NAc, (Glc-NAc) ₄ ≥ (Glc-NAc) ₃ > (Glc-NAc) ₂ > Glc-NAc. NANA
結合阻害糖 (モル数)	Gal-NAc (0.10 M) Gal (0.10 M)	Gal-NAc (0.10 M) Gal (0.10 M)	Gal-NAc (0.10 M) Gal (0.10 M)	NANA (0.05 M)	Glc-NAc (0.20 M)
反応様式 (反応濃度)	lectin-goldによる直接法			fetuin (3.5 μg/ml) -gold	ovomucoid (5.0 μg/ml) -gold
				による間接法	

*.NGNA:N-glycolylneuraminic acid

†The Function and Lectin Receptors in the Guinea Pig Stria Vascularis

Shoji Nishiyama¹⁾, Harumichi Seguchi²⁾ and Eva Garcia²⁾

1) 高知医科大学耳鼻咽喉科学教室

2) 高知医科大学第2解剖学教室

灌流した後、血管条を摘出し、更に1時間浸漬固定した。組織は0.1 M カコジル酸緩衝 50 mM 塩化アンモニウム液で30分間処理後、 -35°C まで段階的に温度を下げつつエタノール系列で脱水、 -35°C で紫外線下に Lowicryl K4M に包埋した¹⁴⁾。超薄切片は parlodion-carbon コートしたニッケルグリッドに載せ、レクチンの組織化学に供した。

用いた試薬のうち、SBA, RCA-II は Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA) より、HPA, LFA, WGA は E・Y Labs Inc. (San Mateo, CA, USA) より、fetuin, ovomucoid と結合阻害に用いた糖は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より入手した。用いたレクチンとその糖結合特異性¹⁵⁾¹⁶⁾、反応阻害に用いた糖、反応様式を表1に示す。

Frens の方法¹⁷⁾により径 15 nm の colloidal gold を作成し、colloidal gold と SBA, HPA, RCA-II, fetuin, ovomucoid との結合は Roth の方法¹⁸⁾²⁰⁾と、Geoghagen と Ackerman の方法¹⁹⁾を用いて作成した。用いたレクチンのうち N-acetylgalactosamine (Gal-NAc) や galactose (Gal) と結合する SBA, HPA, RCA-II は lectin-colloidal gold による直接法で、N-acetylneuraminic acid (NANA) に結合する LFA と N-acetylglucosamine (Glc-NAc) に結合する WGA は、それぞれ fetuin-colloidal gold, ovomucoid-colloidal gold を用いた間接法で

反応を行った²⁰⁾²¹⁾。

LFA のためには 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2)-0.15 M NaCl (TBS) を、その他のレクチンのためには 0.01 M Phosphate buffer (pH 7.4)-0.15 M NaCl (PBS) を用い、超薄切片の載ったグリッドをリンスした後、SBA, HPA, RCA-II の各 lectin-colloidal gold と WGA は室温で30分間、LFA は室温で60分間反応を行い、PBS 又は TBS で洗浄した。WGA, LFA では更に ovomucoid-colloidal gold, fetuin-colloidal gold をそれぞれ室温で30分間反応させ、PBS 又は TBS で洗浄後、最後に再蒸留水で洗浄した。反応条件を一定にするために、PBS, TBS による洗浄は各々2分間の jet washing を2回行い、各レクチン、fetuin, ovomucoid の濃度は back ground が消失する最高濃度を用いた(表

レクチン	SBA	HPA	RCA-II	LFA	WGA
腔側形質膜	+	+	+	-	+
核上部小胞	+	+	+	+	+
基底陥入	+	+	+	+	+
毛細血管 内皮基底膜	+	+	+	+	+

表2 各部位でのレクチンによる標識

単位長さ、あるいは単位面積当りの金粒子の数を基に4段階に評価した。
 ++: 強い標識、+: 中程度の標識、+: 弱い標識、-: 標識なし

1 a 血管条上部を示す。辺縁細胞 (M) の腔側形質膜には中程度の標識がみられ、核上部小胞と endosome には強い標識がみられる。一方、中間細胞 (I) には標識はほとんどみられない。Bar=1 μm

1 b 辺縁細胞核上部を示す。腔側形質膜では小胞開口部(矢印)に標識がみられる傾向がある。小胞の中には標識のみられないものも存在する。endosome では限界膜の内腔面に沿って標識がみられる。Bar=1 μm

図1 SBA-colloidal gold による標識

1)。反応終了後、酢酸ウラン、クエン酸鉛で電子染色後 JEM-100S 電子顕微鏡で観察した。対照として、糖結合特異性を見るために、反応の30分前に各結合阻害糖を加えた後、糖結合反応を行った。又、WGA と LFA とでは標識の特異性を見るために WGA 及び LFA の反応段階を除いたものも行った。

結 果

単位長さあるいは単位面積当りの金粒子の数を基に 4 段階に評価した結果を表 2 に示した。Gal-NAc や Gal に結合を示す SBA, HPA, RCA-II は、ほぼ同様の反応様式を示し、辺縁細胞の腔側形質膜の特に microvilli や小胞の開口部に一致して反応がみられる傾向があった。

2 a 血管条上部を示す。辺縁細胞 (M) 腔側形質膜の標識は弱いが、核上部小胞、基底陷入、毛細血管 (C) 内皮基底膜には標識がみられる。Bar=1 μ m

2 b 辺縁細胞核上部を示す。小胞には強い標識がみられる。腔側形質膜の microvilli にも標識がみられる。Bar=1 μ m

図 2 HPA-colloidal gold による標識

3 a 辺縁細胞核上部を示す。腔側形質膜の microvilli に標識がみられる。Bar=1 μ m 挿入図では小胞の開口部 (矢印) への標識がみられる。Bar=0.2 μ m

3 b 辺縁細胞基底陷入部では軽度の標識がみられる。Bar=1 μ m

図 3 RCA-II-colloidal gold による標識

4 a 辺縁細胞核上部を示す。腔側形質膜には標識はみられず、小胞への標識も極軽度みられるにすぎない。Bar=1 μ m

4 b 辺縁細胞基底陥入部と毛細血管(C)内皮基底膜と腔側形質膜には中程度の標識がみられる。Bar=1 μ m

図4 LFA-fetuin-colloidal gold による標識

5 a 辺縁細胞核上部を示す。標識は腔側形質膜や小胞の限界膜にみられる。Bar=1 μ m

5 b 辺縁細胞基底陥入部でも形質膜に沿って強い標識がみられる。Bar=1 μ m

図5 WGA-ovomucoid-colloidal gold による標識

核上部小胞には強い反応がみられ、endosome にも反応がみられた(図1, 2, 3)。但し、反応のみられない小胞も存在していた。これよりも弱い反応ではあるが、基底陥入部と毛細血管内皮基底膜にも反応がみられた。LFA は辺縁細胞腔側形質膜には反応がみられず、核上部小胞での反応も極めて弱いものであった。一方、基底陥入部と、毛細血管内皮基底膜には中程度の反応がみ

れた(図4)。WGA は血管条を構成する全ての細胞の形質膜と辺縁細胞核上部の多くの小胞の限界膜に強い反応がみられた(図5)。各結合障害糖で処理した後に反応を行った対照実験では、RCA-II の Gal-NAc による障害のみ軽度であったが、それ以外のものでは反応は消失ないしは強い減弱を示した。又、WGA と LFA におけるレクチン反応段階を除いた対照実験では、全く反応は認め

られなかった。

考 察

レクチンの糖特異性は相対的なものであり、複数の糖に対し特異性を有している場合、反応が単糖やオリゴ糖で阻害されても、糖結合部位はもっと複雑な糖構造を認識するため、同じ単糖で阻害を受けるレクチンの真の結合特異性には明確な違いがあることが多く、単糖レベルでのレクチンの結合特異性を基にして複合糖質の異同や変化の解析を行うことは危険であると言われている²⁾³⁾。今回、Gal-NAc と Gal の両方に特異性を示す SBA, HPA, RCA-II の反応の結果は、表 2 に示すように部位に応じてほぼ同じ傾向を示した。更に、結合阻害糖による対照実験では、RCA-II の Gal-NAc による反応阻害は軽度であったが、それ以外のものでは反応は全く消失していた。これらの結果より、これら 3 種のレクチンは Gal-NAc と Gal の両者を認識していると考えられる。内耳におけるレクチンを用いた報告のうち Gal-NAc の検出は、耳石器や内リンパ嚢で光学顕微鏡的に試みられているが、これらの報告では反応はみられないか極めて弱いとされている⁴⁾⁸⁾⁹⁾。従って、Gal-NAc に対する強い反応を示した部位の報告は内耳では、これが最初である。更に興味深いことは、これら 3 種のレクチンに反応を示した辺縁細胞腔側形質膜の microvilli, 核上部小胞とその開口部, endosome の膜は同じ性質を持っていると考えられることである。これらの膜は図 6 に示したように、飲作用により物質を取り込み、小胞を経由して endosome に輸送する吸収機能と、endosome から小胞を経由して内リンパ腔に物質を輸送する分泌機能の両者

図 6 血管条辺縁細胞核上部における内リンパの吸収と産生のモデル

に関与していると考えられ、この系は Na^+ と K^+ の交換にとって都合の良い構造となっている可能性があり、反応を示した糖鎖はこの系で再循環していると考えられる。このことは、辺縁細胞のカチオン化フェリチンの取り込み実験¹³⁾からも支持されるものである。膜における受容体の再循環は、いろいろな実験から明らかにされてきており²²⁾、辺縁細胞膜核上部でも輸送タンパク受容体が再循環している可能性がある。

LFA は辺縁細胞腔側形質膜には全く反応はみられず、核上部小胞にもほとんどみられなかった一方、基底陥入部と毛細血管内皮基底膜には反応がみられ、結合阻害糖により反応が消失したことよりこの部位に NANA (シアル酸) が存在することは確実である。以前我々は、辺縁細胞核上部の多くの小胞に強い反応がみられたと報告したが¹¹⁾、その後検討した結果、反応後の洗浄が不十分であったことがわかった。反応の程度は用いたレクチンの濃度と洗浄方法と時間に影響を受けることがあり、今回前述した洗浄法に変更した結果、一定した反応結果が得られるようになった。ここで興味深いことは、辺縁細胞、毛細血管を通じ NANA の分布に極性があることである。Roth ら²³⁾ は、腎尿細管上皮で LFA の反応をみた結果、近位尿細管と Henle の係蹄の細い部分の上皮の腔側形質膜には反応がみられるが、Henle の係蹄の太い上行脚の部分の腔側形質膜には反応がみられなかったことを報告しており、後者には陰性荷電を有するシアル酸が存在せず、この部位での Cl^- などの陰イオンの再吸収に関与しているのではないかと述べている。血管条辺縁細胞基底陥入部には Na-K-ATPase が局在し、この部位で K^+ が辺縁細胞内に取り込まれ、 Na^+ が細胞間隙に排出される選択的能動輸送が行われていることが明らかになっており¹²⁾、辺縁細胞基底陥入部や毛細血管上皮基底膜に陰性荷電を有するシアル酸が存在することは、この能動輸送に先立って、この部位に K^+ などの陽イオンを引き付ける役割を果たしているものと考えられる。

WGA は血管条を構成する全ての細胞の形質膜と辺縁細胞核上部の多くの小胞の限界膜で反応がみられ、対照実験からこの部位に Glc-NAc が存在することが確認された。Glc-NAc は膜の糖鎖抗原の重要な担手の一つであり、糖鎖の基本構造の一つといわれており²⁴⁾、血管条の細胞においてもその分布に偏りが無いものと考えられる。

組織構造物との非架橋性低温包埋剤である Lowicryl K4M を用いることにより糖鎖抗原の保存は飛躍的に改善され、post-embedding 法でレクチンを用い非常に鋭敏に正確な糖の検出が可能になった²⁵⁾。しかし、内耳におけるこの方法を用いた研究はまだ少なく⁷⁾¹¹⁾、今後さらに発展させる必要がある。

ま と め

血管条におけるレクチンの結合部位を SBA, HPA, RCA-II, LFA, WGA の 5 種のレクチンを用い, Lowicryl K4M に包埋した超薄切片で, colloidal gold を標識とし, 電子顕微鏡的に明らかにした。

SBA, HPA, RCA-II は辺縁細胞腔側の microvilli 及び飲小胞開口部の形質膜と, 一部の核上部小胞及び endosome の限界膜に反応がみられ, Gal と Gal-NAc の存在が確認された。これらの膜は同じ性質を持っていると考えられ, 飲作用により物質を取り込み, 小胞を経由して endosome に輸送する吸収機能と, endosome から小胞を経由して内リンパ腔に輸送する分泌機能に関与していると考えられる。この系は Na^+ と K^+ の交換にとって都合の良い構造となっている可能性があり, 反応を示した糖鎖はこの系で再循環していると考えられる。

LFA は辺縁細胞基底陥入部と毛細血管内皮基底膜に反応がみられ, LFA が特異的に結合する NANA (シアール酸) は陰性荷電を有しており, イオン組成の選択的取り込みに関与していると考えられる。

WGA は血管条を構成する全ての細胞の形質膜で反応がみられ, Glc-NAc は膜上での分布に偏りがないと考えられる。

謝 辞

この研究は平成元年度厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班(班長 北原正章)の研究補助金の援助による。

文 献

- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, et al : What should be called a lectin. *Nature* 285 : 66, 1980
- 大沢利昭 : 総論. 大沢利昭編. レクチンと細胞生物学. 1-15頁, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1985
- 平野 寛, 川上速人 : III. レクチン 1. 総論. 平野 寛, 川生 明, 横山正夫編. マニュアル実験組織化学, 500-502頁, 丸善株式会社, 東京, 1987
- Gil-Loyzaga P, Gabrion J, Uziel A : Lectins demonstrate the presence of carbohydrates in the tectorial membrane of mammalian cochlea. *Hearing Res* 20 : 1-8, 1985
- Khalkhali-Ellis Z, Hemming FW, Steel KP : Glycoconjugates of the tectorial membrane. *Hearing Res* 25 : 185-191, 1987
- Tachibana M, Morioka H, Machino M, et al : Cytochemical localization of specific carbohydrates in the cochlea using wheat germ agglutinin-gold. *Hearing Res* 25 : 115-119, 1987
- Tachibana M, Morioka H, Machino M, et al : Wheat germ agglutinin binding sites in the organ of Corti as revealed by lectin-gold labeling. *Hearing Res* 27 : 239-244, 1987
- Gil-Loyzaga P, Raymond J, Gabrion J : Carbohydrates detected by lectins in the vestibular organ. *Hearing Res* 18 : 269-272, 1985
- Takumida M, Bagger-Sjögård D, Rask-Andersen H : Lectin detection of carbohydrates in the endolymphatic sac. *Arch Otorhinolaryngol* 246 : 89-93, 1989
- Tachibana M, Morioka H, Machino M, et al : Cupulogenesis and glycoconjugates in the labyrinthine ampulla as revealed by WGA-gold labeling. *Arch Otorhinolaryngol* 244 : 112-116, 1987
- 瀬口春道, 小林俊博, Garcia E, 西山正司 : モルモット血管条のレクチン結合部位. *Equilibrium Res Suppl* 5 : 78-83, 1989
- Kobayashi T, Seguchi H, Okada T, et al : Ultra-cytochemical study of the stria vascularis of the guinea pig cochlea. *Anat Anz Jena* 160 : 101-114, 1985
- 瀬口春道, 小林俊博 : 血管条辺縁細胞のカチオン化フェリチンの取り込みに対するモネンシンとウアバインの影響. *Equilibrium Res Suppl* 2 : 60-68, 1987
- Carlemalm E, Garavito RM, Villiger W : Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J Microscopy* 126 : 123-143, 1982
- 辻 勉, 松本勲武, 山本一夫 : レクチンの結合特異性. 大沢利昭編. レクチンと細胞生物学. 69-112 頁, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1985
- Roth J : The lectins ; molecular probes in cell biology and membrane research. In ed Bolck F, Goerttler KI, Güthert H, et al. *Experimental Pathology Suppl* 3. pp 11-29, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1978
- Frens G : Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci* 241 : 20-22, 1973
- Roth J : The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In ed Bullock GR, Petrusz P. *Techniques in immunocytochemistry* vol. 2, pp 218-284, Academic Press Inc, London, 1983
- Geoghegan WD, Ackerman GA : Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-im-

munoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of Concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level : A new method, theory and application. *J Histochem Cytochem* 25 : 1187-1200, 1977

- 20) Roth J, Lucocq JM, Charest PM : Light and electron microscopic demonstration of sialic acid residues with the lectin from *Limax flavus* : A cytochemical affinity technique with the use of fetuin-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 32 : 1167-1176, 1984
- 21) Roth J : Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J Histochem Cytochem* 31 : 987-999, 1983
- 22) 田代 裕 : 受容体 仲介エンドサイトーシス. 田代 裕, 金関 恵編. 細胞の分泌と吸収. 189-216頁, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1983
- 23) Roth J, Taatjes DJ : Glycocalyx heterogeneity of rat kidney urinary tubule : demonstration with a lectin-gold technique specific for sialic acid. *European J Cell Biol* 39 : 449-457, 1985
- 24) 村松 喬 : 細胞表面の糖鎖抗原. 耳鼻 29 : 897-903, 1983
- 25) Roth J : Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents : A review. *J Microscopy* 143 : 125-137, 1986

Abstract

Soybean agglutinin (SBA), helix pomatia agglutinin (HPA), ricinus communis agglutinin- II (RCA-II), limax flavus agglutinin (LFA) and wheat germ agglutinin (WGA) were employed to localize, with a lectin-gold technique, specific carbohydrates on thin

sections of guinea pig stria vascularis embedded in Lowicryl K4M.

Galactose and N-acetylgalactosamine labeled with SBA, HPA and RCA-II were found in many cytoplasmic vesicles and endosomes located in the supranuclear region, as well as in the microvilli and in the plasma membranes of internalization of marginal cells.

LFA labeling, indicating the distribution of sialic acid residues, was found in the basement membrane of the perivascular spaces and intercellular spaces between marginal and intermediate cells and between marginal and basal cells. Plasma membranes, however, were unlabeled in all types of cells.

WGA binding sites showing the localization of N-acetylgalactosamine, on the other hand, were detected along the plasma membranes of all types of cells constituting the stria vascularis and in some supranuclear cytoplasmic vesicles in marginal cells.

These findings revealed that the membranes of internalization and some cytoplasmic vesicles were associated with endosomes in the supranuclear region of the marginal cells. It is probable that these structures are related to the functions of absorption and secretion, and that the carbohydrates labeled with SBA, HPA and RCA-II are recirculated in this system, the exchange between Na⁺ and K⁺ facilitating.

Key words: stria vascularis, lectin-gold, carbohydrate

(原稿到着 : 平成 2 年 3 月 2 日
別刷請求先 : 西山正司
〒781-51 南州市岡豊町小蓬
高知医科大学耳鼻咽喉科学教室)