

## 複合糖質を可視化する

大塚 愛二

岡山大学大学院医歯学総合研究科 人体構成学

キーワード：複合糖質，組織化学，プロテオグリカン，電子顕微鏡，光学顕微鏡

### はじめに

複合糖質は，糖鎖と蛋白質や脂質などが結合して複合分子を構成しているもので，その生理作用については広範囲に及んでいる．本稿では，私たちが手がけてきた鉄コロイド法と高分解能走査電顕観察法を中心に，複合糖質の可視化の手法について紹介したい．

### 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡（光顕）で糖質を観察するには，古典的な方法としては，PAS 反応などがある．これは，糖に含まれるアルデヒド基と Schiff 試薬との反応に基づいている．また，硫酸基やカルボキシル基を含む糖質の場合，荷電基に対する静電的結合を利用する陽性荷電鉄コロイド法<sup>1)</sup>や塩基性色素のアルシアン・ブルー染色法などがある．類似のものとして，高铁ジアミン<sup>2,3)</sup>やカチオン化フェリチン<sup>4)</sup>を用いる方法がある．カチオン化金コロイド法<sup>5)</sup>があるが，光顕下に確認するためには銀増感が必要である．特異的な検出方法としては，単糖またはオリゴ糖に特異的に結合する蛋白質のレクチンを用いる方法や抗体を用いた免疫組織化学染色があ

る．プロテオグリカンのように糖鎖と蛋白質とが組み合わさって巨大な分子を作っている場合，コア蛋白質や結合蛋白質を標的として解析を進めることができる<sup>6-8)</sup>．何を染めているのか，何を見ているのかが問われることになる場合，化学的修飾や特異的な酵素による消化によって染色結果がどう変化するかを確認する必要がある．

### 透過型電子顕微鏡による観察

透過型電子顕微鏡（透過電顕）で観察するには，適度な電子密度（電子線の通りにくさ）を持ったもので染める必要がある．糖質をよく染めるものとしてルテニウム・レッドなどが知られている．電顕レベルでの PAS 反応に相当するものとして，PAM 反応が知られている．酸性基を検出する方法として，陽性荷電鉄コロイド法<sup>9-11)</sup>，高铁ジアミン法<sup>2,3)</sup>，カチオン化金コロイド法<sup>5)</sup>，カチオン化フェリチン法<sup>4)</sup>などがある．糖鎖の特異的な検出にレクチンを用いる場合，金コロイドを標識物質として用いる．急速凍結ディープ・エッチング・レプリカ法によって，複合糖質に他の物質を結合させずに観察する試みがなされている<sup>12)</sup>．

### 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡（走査電顕）で複合糖質を観察する試みは，高分解能走査電顕の開発に伴ってなされて

平成17年2月受理

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7088 FAX：086-235-7095

E-mail：aiji@md.okayama-u.ac.jp

### ◆ プロフィール ◆



医学部の学生時代から解剖学教室に出入りし，学生7～8人位で Langman の Medical Embryology を輪読したり，実験の手伝いの真似事をしたり，今では正式なカリキュラムになっている教室配属のはしりのようなものをしていました．大学院に入ってから，脈管系の研究と顕微鏡の医生物学応用の研究を主なテーマとしてきました．そういう中で，複合糖質の組織化学や Glycocalyx の走査電顕観察も試みてきました．今後も方法論の改良を加えながら，人がまだ見えない景色を見ることに挑んでいきたいと思っています．

— 昭和55年岡山大学医学部卒業 —

きた<sup>13,14)</sup>。これらは、必ずしも好結果を得ていなかった。近年、我々は、小腸上皮細胞の刷子縁を覆う糖衣の三次元構築を観察することに成功した<sup>15)</sup>。

### 陽性荷電鉄コロイド法

陽性に荷電した鉄コロイドを用いて組織中の陰性荷電部位の酸性ムコ多糖類 acid mucopolysaccharides (glycoseaminoglycan)を検出する方法は、古く Hale 反応<sup>1)</sup>として知られてきた。これには、多くの変法が開発されたが、とくに妹尾(本学第一病理)らは、カコジル酸緩衝液を用いて中性域から酸性域まで安定な染色用鉄コロイド液を開発した<sup>9)</sup>。さらに、村上らは、抱水ヒドラジン・カコジル酸緩衝液を用いて改良し、極微粒子で安定域の広い(pH 0.8~7.6)コロイド液を開発した<sup>10)</sup>。また、親水性樹脂に包埋した電顕用超薄切片を染める方法を考案した<sup>11)</sup>。この染色法を用いて、腎組織<sup>10,16,17)</sup>、中枢神経組織<sup>18-22)</sup>、軟骨<sup>23)</sup>、末梢神経組織<sup>24)</sup>、腹膜・胸膜・心膜(体腔膜)<sup>17,25,26)</sup>、リンパ性組織<sup>27)</sup>などの組織化学的検索を行ってきた。そのいくつかを紹介する。

中枢神経組織では、成体の脳・脊髄の一部の神経細胞の周囲に pH 1.5の強酸性域でも染まる被膜が存在していることが確認された(図1)。酵素消化法とレクチンを併用した解析を行った結果をもとに、硫酸化プロテオグリカン複合体がコラーゲン様リガンドを介して膜糖蛋白質に結合しているモデルを提唱している<sup>21)</sup>。こ

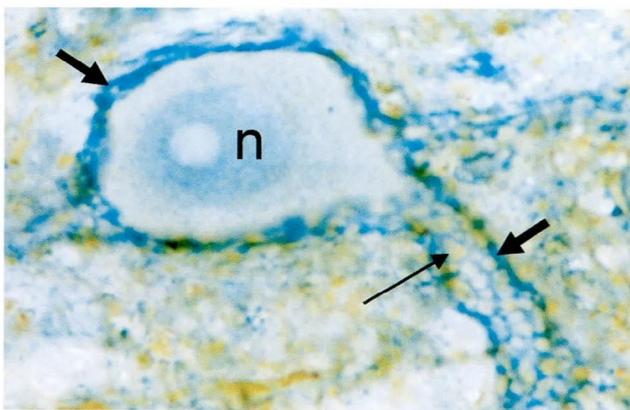


図1 陽性荷電鉄コロイド染色(pH 1.5)(プロシア青反応)および抗 calbindin-D-28K免疫染色(DAB反応)の二重染色を行ったラット内側小脳核神経細胞(n)の光顕像。神経細胞体と樹状突起が鉄コロイドによく染まるプロテオグリカンに網目状に覆われている(太い矢印)。抗 calbindin-D-28K抗体陽性部分(細い矢印)は、小脳皮質 Purkinje 細胞の軸索終末シナプスボタンで、プロテオグリカン神経周囲網の網目に収まっている。×2,000。

のプロテオグリカン複合体は、神経細胞の周囲に網目状をなしており、その網目の中にシナプスボタンがすっぽりと収まっていることを、鉄コロイド染色と免疫染色の2重染色で明らかにし(図1)<sup>20)</sup>、シナプス周囲柵(perisynaptic barrier)と呼んでいる<sup>21)</sup>。近年、このプロテオグリカンをコンドロイチナーゼなどで分解してやると、シナプスの可塑性が高まることが明らかにされている<sup>28)</sup>。すなわち、このシナプス周囲柵は、完成したシナプスを安定化させ、シナプス間の微小環境を保持する働きがあると考えられる。

体腔漿膜、すなわち腹膜・胸膜・心膜の表面は中皮細胞に覆われている。その自由表面には pH 1.5の強酸性域でも陰性に荷電する(解離する)酸性基を豊富にもつことは以前から知られていた。このことは陽性荷電鉄コロイド染色によって確かめられ(図2A)、さらにメチル化・ケン化などの化学修飾やレクチンの応用

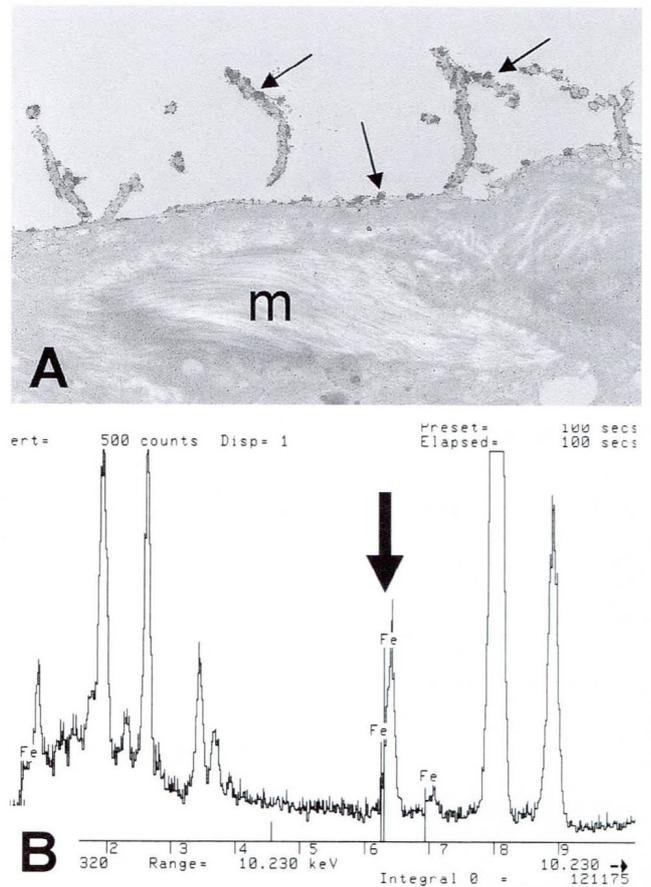


図2 A:陽性荷電鉄コロイド染色(pH 1.5)を施したマウスの腹膜中皮細胞(m)の透過電顕像。微絨毛を含む自由表面に顕著な鉄コロイド沈着が見られる。B:図2Aと同じ領域から Fe に特異的な特性X線が検出され、沈着物が鉄コロイドによるものであることが確認された。A×24,000。

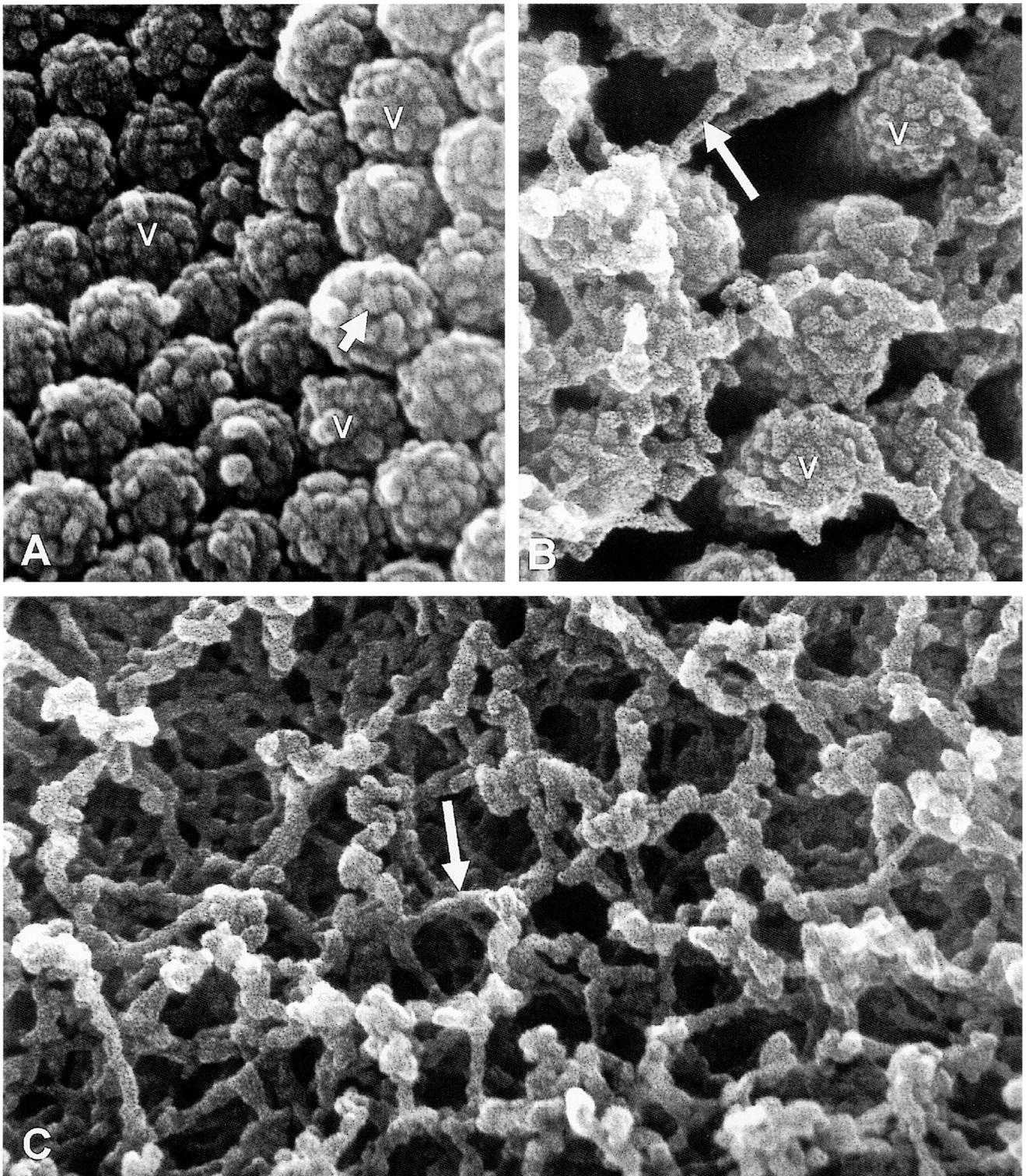


図3 マウス小腸の絨毛上皮細胞の刷子縁表面糖衣層の高分解能走査電顕による観察  
 A：グルタルアルデヒド固定後、pH 7.0の緩衝液で洗浄し、オスミウム後固定したもの。糖衣は剥脱し、微絨毛(v)の表面が露出し、膜蛋白質と思われる小顆粒構造(矢印)が見えている。B：洗浄緩衝液をpH 9.0にした場合、糖衣の一部が保存されている(矢印)が、多くの微絨毛先端(v)が露頭している。C：pH 11.0の緩衝液で洗浄した場合、糖衣層(矢印)が保存され、乾燥処理を含む試料作成過程によく耐えて、剥脱していない。糖衣はやや太くなった顆粒状の部分とそれをつなぐフィラメント状の部分があり、隣り合う微絨毛に由来する部分も互いに連結し細密な叢状を呈する。A, B, C×200,000.

などによりその本態がシアロムチンであることを証明した<sup>25,26)</sup>。光顕的に鉄コロイドの沈着を証明するには三価の鉄に特異的なプロシア青反応を用いるが、電顕的には通常電子密度の高い微粒子として認識される。鉄であることを証明するには、特性X線による分析を試みるとよくわかる(図2B)(未発表)。シアロムチン糖衣によって覆われた漿膜中皮細胞層は、その豊富な陰性荷電によって互いに反発し合い、滑らかな動きを保障し癒着を防いでいるものと考えられる。

### 高分解能走査電顕観察

高分子化合物の複合糖質を走査電顕で直接観察する試みは、高分解能走査電顕の開発に伴ってなされてきた。我々は、最近、腸管上皮細胞自由表面に見られる糖衣 glycoalkyx の超微構造を三次元的に観察することに成功した<sup>15)</sup>。通常の試料処理方法では剥離脱落しやすい糖衣を、固定後の洗浄に用いる緩衝液のpHをアルカリに調製することによって良好に保存することができた(図3)。従来の透過電顕像では隣り合う微絨毛に由来する糖衣は結合していないという説があったが、この高分解能走査電顕観察によって隣り同士互いに完全に連結して三次元的な細密な網状を呈することを明らかにした。このことは、病原体などの侵入を防ぎ、消化管内腔から一定の微小環境をもって腸管上皮細胞を保護するという機能的意義があると考えられる。

### まとめと展望

以上、我々の取り組みも含めて、複合糖質の可視化方法について概説した。方法については、多くの方法が考案されており、目的にかなった方法でアプローチすべきであろう。生きた細胞で観察する方法については、まだ不十分な面が多く、今後の研究が待たれる。糖質系(グリコーム)は、ゲノム-プロテオーム系の次の段階にあり、その多様な分子構造と機能、病態における変化については不明の点が多く、今後の研究課題を多く含んでいる。

### 文 献

- 1) Hale CW: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. *Nature* (1946) **157**, 802.
- 2) Thomopoulos GN, Schulte BA and Spicer SS: The influence of embedding media and fixation on the post-embedding ultrastructural demonstration of complex

carbohydrates. III. High iron diamine staining for sulfated glycoconjugates. *J Histochem Cytochem* (1983) **31**, 871-878.

- 3) Murata F, Tsuyama S, Ihida K, Kashio N, Kawano M and Li ZZ: Sulfated glycoconjugates demonstrated in combination with high iron diamine thiocarbonylhydrazide-silver proteinate and silver acetate physical development. *J Electron Microsc* (1992) **41**, 14-20.
- 4) Danon D, Goldstein L, Marikovsky Y and Skutelsky E: Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J Ultrastruct Res* (1972) **38**, 500-510.
- 5) Kashio N, Tsuyama S, Ihida K and Murata F: Cationic colloidal gold—a probe for light—and electron-microscopic characterization of acidic glycoconjugates using poly-L-lysine gold complex. *Histochem J* (1992) **24**, 419-430.
- 6) Hirakawa S, Oohashi T, Su W-D, Yoshioka H, Murakami T, Arata J and Ninomiya Y: The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochem Biophys Res Comm* (2000) **276**, 982-986.
- 7) Oohashi T, Hirakawa S, Bekku Y, Rauch U, Zimmerman DR, Su W-D, Ohtsuka A, Murakami T and Ninomiya Y: Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the node of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Mol Cell Neurosc* (2002) **19**, 43-57.
- 8) Bekku Y, Su W-D, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, Kang JS, Sander J, Murakami T, Ninomiya Y and Oohashi T: Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosc* (2003) **24**, 148-159.
- 9) Seno S, Ono T and Tsujii T: Macromolecular charge and cellular surface charge in adhesion, ungestion, and blood vessel leakage. *Ann NY Acad Sci* (1983) **416**, 410-425.
- 10) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano K, Kane-shige T, Owen RL and Jones AL: A modified method of fine-granular cationic iron colloid preparation: its use in light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat kidney glomerulus and certain other tissues. *Arch Histol Jpn* (1986) **49**, 13-23.
- 11) Ohtsuka A, Kikuta A, Taguchi T and Murakami T: A hydrophilic resin-embedding method for light and electron microscopic detection of tissue anionic sites with cationic colloidal iron: as applied to mouse Paneth cells. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 423-430.
- 12) Kacher B, Liang F, Lins U, Ding M, Wu X-R, Stoffler D, Aebi U and Sun T-T: Three-dimensional analysis of the 16nm urothelial plaque particle: luminal surface

- exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. *J Mol Biol* (1999) **285**, 595-608.
- 13) Jones BJ and Murphy CR : A high resolution study of the glycocalyx of the rat uterine epithelial cells during early pregnancy with the field emission gun scanning electron microscope. *J Anat* (1994) **185**, 443-446.
  - 14) Jonegebloed WL, Stokroos I, van der Want JJL and Kalicharan D : Non-coating fixation techniques or redundancy of conductive coating, low kV FE-SEM operation and combined SEM/TEM of biological tissues. *J Microsc* (1999) **193**, 158-170.
  - 15) Horiuchi K, Naito I, Nakano K, Nakatani S, Nishida K, Taguchi T and Ohtsuka A : Three-dimensional ultra-structure of the brush border glycocalyx in the mouse small intestine : a high resolution scanning electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* (2005) **68**, in press.
  - 16) 大塚愛二, 宇野芳史, 田口勇仁, 村上宅郎 : 陽性および陰性荷電鉄コロイドによる組織・細胞荷電基の光顕ならびに電顕的検出. *岡山医誌* (1991) **103**, 11-18.
  - 17) Ohtsuka A, Nakatani S, Horiuchi K, Taguchi T and Murakami T : Repulsive charge mechanism serve to maintain lumens and cavities. An histochemical study of rat serosa and kidney; in *Advances in microanatomy of cells and Tissues*, PM Motta, G Macchiarelli and SA Nottola eds, *Ital J Anat Embryol* (2001) **106 (2) Suppl 1**, 379-384.
  - 18) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A and Kikuta A : Neurons with strongly negative-charged surface-coats in adult rat brain as detected by staining with cationic iron colloid. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 13-21.
  - 19) Murakami T, Murakami T, Su WD, Ohtsuka A, Abe K and Ninomiya Y : Perineuronal nets of proteoglycans in the adult mouse brain are digested by collagenase. *Arch Histol Cytol* (1999) **62**, 199-204.
  - 20) Ohtsuka A, Taguchi T, Sayed R and Murakami T : The spatial relationship between the perineuronal proteoglycan network and the synaptic boutons as visualized by double staining with cationic colloidal iron method and anti-calbindin-D-28K immunohistochemistry in rat cerebellar nuclei. *Arch Histol Cytol* (2000) **63**, 313-318.
  - 21) Murakami T and Ohtsuka A : Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Arch Histol Cytol* (2003) **66**, 195-207.
  - 22) Taguchi T, Ohtsuka A and Murakami T : Light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat choroid plexus. *Arch Histol Cytol* (1998) **61**, 243-252.
  - 23) Yoshikawa T, Nishida K, Doi T, Inoue H, Ohtsuka A, Taguchi T and Murakami T : Negative charges bound to collagen fibrils in the rabbit articular cartilage : a light and electron microscopic study using cationic colloidal iron. *Arch Histol Cytol* (1997) **60**, 435-443.
  - 24) Toda K, Nishida K, Inoue H, Ohtsuka A and Murakami T : Strongly anionic sites in peripheral axons of the rat sciatic nerve : light and electron microscopic detections using cationic colloidal iron. *Arch Histol Cytol* (1995) **58**, 485-492.
  - 25) Ohtsuka A and Murakami T : Anionic sites on the free surface of the peritoneal mesothelium : light and electron microscopic detection using cationic colloidal iron. *Arch Histol Cytol* (1994) **57**, 307-315.
  - 26) Ohtsuka A, Yamana S and Murakami T : Localization of membrane-associated sialomucin on the free surface of mesothelial cells of the pleura, pericardium, and peritoneum. *Histochem Cell Biol* (1997) **107**, 441-447.
  - 27) Sunami-Kataoka Y, Akagai H, Nishizaki K, Taguchi T, Murakami T and Ohtsuka A : Chondroitin sulfate proteoglycan at the basal lamina beneath high endothelial cells in human palatine tonsils : a light and electron microscopic study using the cationic colloidal iron method. *Arch Histol Cytol* (2001) **64**, 535-543.
  - 28) Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW and Maffei L : Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* (2002) **298**, 1248-1251.