

# イヌ涙腺組織における炭酸脱水酵素 アイソザイム (CA-VI) の発現について

*Expression of Carbonic Anhydrase Isoenzyme VI (CA-VI) in Canine Lacrimal Glands*

市原伸恒

麻布大学大学院獣医学研究科

Nobutsune Ichihara

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

**Abstract.** The expression of carbonic anhydrase VI protein and mRNA were investigated in canine lacrimal glands. Immunohistochemical staining of lacrimal glands was detected CA-VI protein in some aciner cells, but not in ductal cells. The presence of CA-VI mRNA in canine lacrimal glands was demonstrated by RT-PCR. RT-PCR amplification of CA-VI mRNA generated a band of the predicted 441 base pairs for CA-VI mRNA. These results indicates the canine lacrimal glands synthesize and secrete CA-VI protein. It was reported that the corneal epithelia of canine has shown of CA activity, and the function of CA are transportation of CO<sub>2</sub> across the cornea. Therefore Although the physiological signification was unknown, in addition to CA in corneal epithelia, secreted CA-VI from lacrimal glands are play a role of maintenance of acid/base balance in microcircumstance around eyes.

## 1. 目的

炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase: CA) は、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  の反応を触媒する酵素であり、CA の存在下では、上記反応の転換速度は非触媒反応の  $10^7$  倍も速く、CA が生体内に存在しなければ、CO<sub>2</sub> の完全な水和は行われないとされている (1)。CA は上記反応の触媒作用を示すことより、CO<sub>2</sub>、H<sup>+</sup> を産生する臓器・組織の機能と関係が深く、生体内に広く分布している (2, 3, 4)。これまで報告されている9種類の炭酸脱水酵素アイソザイムの中で唯一の分泌型アイソザイムである Carbonic Anhydrase-VI (CA-VI) は、ヒツジの唾液中に発見された炭酸脱水酵素アイソザイムである (5)。これまで我々はイヌやウシにおいて主要な分泌母地

である唾液腺での CA-VI の組織局在や発現を蛋白、遺伝子の両面から精査してきた。その結果、外分泌腺である唾液腺の漿液細胞において、CA-VI の組織局在を認めている (6)。

涙液は角膜上皮ならびに結膜上皮の生理的環境を整える重要な外分泌液であり、眼球周囲の酸・塩基平衡環境を安定させるために、CA-VI が重要な役割を担っていることが類推され、涙腺における CA-VI の蛋白質ならびに遺伝子の発現はラットで報告されている (7)。本研究ではこれまで様々な外分泌腺における CA-VI の発現を精査してきた犬を対象に、角膜や結膜を覆う涙液の分泌母地である涙腺組織における CA-VI の蛋白質発現を免疫組織化学法を用いて、また、遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

## 2. 方法

材料は、健康な成犬（ビーグル犬）3個体より採取した涙腺組織を用いた。

**免疫組織化学法：**採取した涙腺を Bouin 液で固定した後、常法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ4 $\mu$ mのパラフィン切片を作製した。得られた切片の脱パラフィン後、一次抗体として抗イヌ CA-VI 家兎血清を用いて、間接法にて免疫組織化学染色を行った。DAB 溶液にて発色を行った後、光学顕微鏡にて観察した。

**RT-PCR 法：**採取した涙腺より RNA 溶液を調整した後、イヌ CA-VI cDNA 配列全長の 382～399 番の塩基配列をセンスプライマー（5'-CAG CGG CTC GGA GCA TAC-3'）として、また 822～802 番の塩基配列をアンチセンスプライマー（5'-GGC TGG ATC CTG CGG TAG TCA-3'）として、RT-PCR を行った。内部標準にはイヌ GAPDH を用いた。得られた RT-PCR 産物を 1.5% アガロースゲル（アガロース S, ニッポンジーン）を用いて電気泳動し、臭化エチジウム溶液にて染色した後、254 nm の紫外線の照射下で写真撮影した。

## 3. 結果と考察

（結果）

**免疫組織化学法：**腺房細胞においてモザイク状（heterogeneity）に抗イヌ CA-VI 家兎血清に対する陽性反応が見られた（Fig. 1）。また、導管上皮細胞には陽性反応を認めなかった。

**RT-PCR 法：**採材した涙腺組織由来の total RNA を用いた RT-PCR によって、CA-VI mRNA の発現を調べた結果、目的とする 441 bp の大きさの増幅産物が検出された。また、内部標準として用いたイヌ GAPDH mRNA の 334 bp の大きさの増幅産物も検出された（Fig. 2）。

（考察）

本実験では、犬の涙腺組織における分泌型炭酸脱水酵素アイソザイムである CA-VI の蛋白質ならびに遺伝子の発現を、免疫組織化学法ならびに RT-PCR

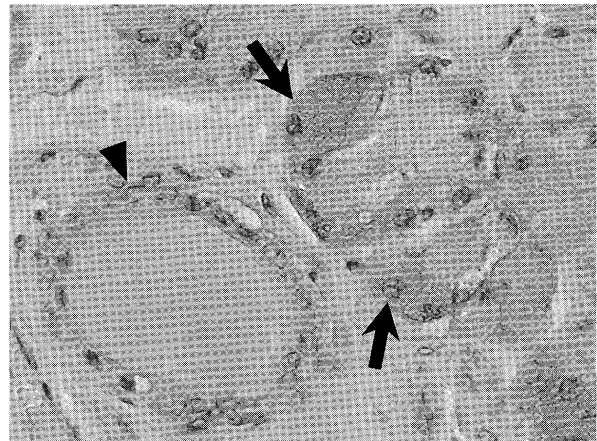


Fig.1 Immunohistochemistry of CA-VI in canine lacrimal glands. Some Acinar cells express CA-VI immunoreactivity (arrows). CA-VI immunoreaction were absent from ductal cells (arrowhead).

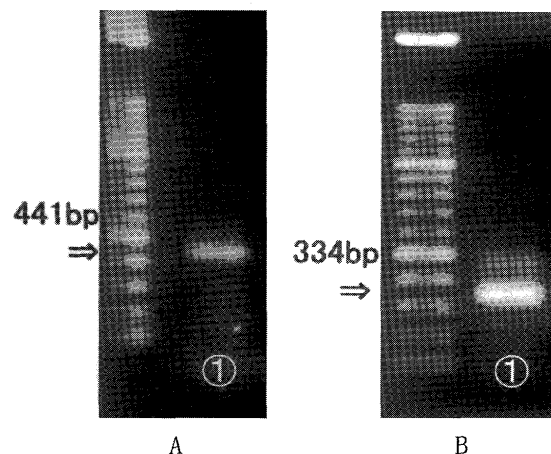


Fig.2 RT-PCR analysis of CA-VI mRNA in canine lacrimal glands. A, PCR product of CA-VI from canine lacrimal glands.; B, PCR product of GAPDH as internal standard.

法を用いて確認した。今回の結果から涙腺を構成する腺房細胞では CA-VI の産生、分泌が行われていると考えられる。涙腺の腺房細胞からの分泌物である涙液は、涙腺で産生された後、結膜円蓋より分泌され、角膜表面に存在する涙膜の形成に参加し、また結膜表面を覆う。そして眼球周囲における涙液は、内側眼瞼交連にある涙点へと流れていく。このように涙液は結膜や角膜を覆うことにより、角膜表面に光学的に平滑な面を作り、機械的にこれらの膜表面の異物を洗い流すとともに、角膜や結膜の上皮の生理的環境を整える役割を担っている。涙液中に含まれる CA が、生理学的に酸塩基平衡にどの程度関わ

ているかは不明だが、眼球表面を覆う涙液の酸塩基平衡に関与していることが予想される。今回の免疫組織化学染色の結果では、これまで報告のあるラットの涙腺における CA-VI の組織局在と同様に、CA-VI が局在する腺房細胞は腺房を構成する腺細胞の一部であった。従って、その分泌量は多くの漿液細胞に CA-VI が局在する唾液腺などに比べ、少ないものと考えられる。しかし瞬きにより、涙液中に含まれる水分が蒸散され、CA-VI 濃度は上昇するため、分泌される CA-VI は微量であっても、眼球周囲の局所における緩衝作用には十分であるとされている (8)。角膜上皮には様々な動物で炭酸脱水酵素の酵素活性があることが知られており、犬の角膜上皮においても CA の酵素活性が認められており、角膜上皮を通過する CO<sub>2</sub> の移動に関与していると考えられている (9)。したがって角膜上皮に存在する CA に加え、涙腺組織から分泌されている CA-VI が、角膜上皮も含めた眼球周囲の局所的な環境における酸塩基平衡に関与していると考えられる。

#### 4. 要約

角膜や結膜を覆う涙液の分泌母地である犬涙腺組織を対象に、分泌型炭酸脱水酵素アイソザイム Carbonic Anhydrase-VI (CA-VI) の蛋白質発現を免疫組織化学的手法を用い、ならびに遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、免疫組織化学染色では腺房を構成する腺房細胞の一部に免疫陽性

反応を認めたが、導管上皮細胞には認めなかった。RT-PCR 法ではイヌ CA-VI と考えられる 441 bp の大きさの増幅産物を認めた。犬の角膜上皮には CA の酵素活性があることが報告されており、本実験から犬の角膜上皮に存在する CA に加え、涙腺組織から分泌されている CA-VI が、眼球周囲の局所的な環境における酸塩基平衡に関与していると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Stryer, L. In: Biochemistry Freeman international Edition. 115-129pp. W.H.Freeman and Company, San Francisco. 1975.
- 2) Taki, K., Mizuno, K., Takahashi, N., Wakusawa, R., *Jpn J Physiol.* 36: 523-532. 1986.
- 3) Kivela A.J., Kivela, J., Saarnio J., Parkkila S. *World J Gastroenterol.* 11: 155-163. 2005.
- 4) Henry R.P., Swenson, E.R. *Respir Physiol.* 121: 1-12. 2000.
- 5) Fernley, R.T., Wright, R.D., Coghlan J.P. *FEBS Lett.* 105: 299-302. 1979.
- 6) Kaseda, M., Ichihara, N., Nishita, T., Amasaki, H., Asari, M. *J Vet Med Sci.* 68: 131-5. 2006.
- 7) Ogawa, Y., Toyosawa, S., Inagaki, T., Hong, S.S., Ijuhin N. *Histochemistry.* 103: 387-394. 1995.
- 8) Ogawa, Y., Matsumoto, K., Maeda, T., Tamai, R., Suzuki, T., Sasano, H., Fernley R.T. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 821-828. 2002.
- 9) Conroy C.W., Buck, R.H., Maren T.H. *Exp Eye Res.* 55: 637-640. 1992.