

# ヒト正常皮膚組織における Carbonic Anhydrase I, IIの局在

小野麻理子

Carbonic Anhydrase (CA) I, IIの正常皮膚組織における局在を, 蛍光抗体直接法, 酵素化学的検出法, 免疫組織化学的 in situ ハイブリダイゼーション法を用いて, 免疫学的抗原性, 酵素活性, m-RNA の存在を検討した. その結果, CA IIはエクリン汗腺細胞に多く認められた. また, 表皮細胞にも多く存在し, その他にも線維芽細胞様細胞, 血管壁に存在した. さらに, 主に赤血球中に存在するとされている CA Iも, 皮膚及びその付属器に微量ながら確認された.

CAの局在は分泌細胞を中心に各臓器にわたって証明されているが皮膚においてはほとんど注目されていなかった. また, CAは亜鉛を含む金属酵素で膠原病患者の血中に抗CA抗体が証明されたことにより, 皮膚疾患への関与も考えられる. CAの皮膚における機能等の詳細は不明であるが, 今後検討していきたい. (平成4年6月11日採用)

## The Localization of Carbonic Anhydrase I, II in Normal Human Skin

Mariko Ono

Carbonic anhydrase I and II (CA I, CA II) in normal human skin were examined using the direct immunofluorescence technique, the histochemical method of Hansson, and in situ hybridization. All these methods revealed that CA I and CA II were localized in the eccrine glands, epidermal cells, fibroblasts and endothelial cells. They were not evident in either the collagen fibers or the matrix.

(Accepted on June 11, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(2):101-107, 1992

**Key Words** ① Carbonic anhydrase ② Localization  
③ In situ hybridization

### はじめに

Carbonic Anhydrase (CA) (EC 4, 2, 1, 1) はバクテリアから, 植物, 動物まで広く存在する酵素<sup>1), 2)</sup>である. 本酵素は Meldrum と Roughton (1933)<sup>3)</sup>によって赤血球より最初に発見された. その生理作用の一つは  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}^+$  の反応を速やかに触媒するものであり,

生体内の酸塩基平衡に重要な関わりを持っている. また, 分子内に1個の亜鉛を含む金属酵素で, 亜鉛はその活性に重要な役割を担っている.<sup>4)</sup>

1960年代にCAには2個のアイソザイムがあることが発見されてから, 現在までにヒトでは少なくとも7個のアイソザイムが存在することが確認されている.<sup>5)</sup> そのうちのCA I, II, IIIは水溶性細胞質性アイソザイム<sup>6)</sup>で, CA IVは膜結合性アイソザイム,<sup>7)</sup> CA Vはミトコンドリ

ア基質酵素,<sup>8)</sup> CA VI は分泌性アイソザイム<sup>9)</sup> である。それぞれのアイソザイムは臓器分布を異にし、機能的にも異なると考えられている。なかでも CA I, CA II は赤血球を中心に腎臓や胃粘膜上皮等比較的広範囲に存在する。何れも分子量は約30,000で、259または260の残基よりなる小分子量蛋白(MW-30Kd)であり構築は非常に類似しているが、CA I は低活性、CA II は高活性である。<sup>10)</sup>

皮膚組織では O. Braun-Falco ら(1955)<sup>11)</sup> や Hansson ら(1967)<sup>12)</sup> が酵素化学的に表皮に認められることを報告しているのみである。しかし、皮膚における本酵素の合成様式や機能等の詳細については不明である。最近、膠原病患者血中に抗 CA 抗体も発見され、<sup>13)</sup> 皮膚における CA の重要性にも着目すべきであると考え、我々は皮膚組織における CA I, II の局在を免疫学的、分子生物学的方法により検討した。又、従来皮膚では行われていなかった、高感度で再現性の高い Sugai ら<sup>14)</sup> の方法を用いて酵素化学的な CA の存在の証明を試みた。

### 材料および実験方法

#### 1. 蛍光抗体直接法

クリオスタットマイクロトームで厚さ4-6 $\mu$ m のヒト正常皮膚組織凍結切片を作成し、十分に風乾した後、アセトン固定(-20°C)を行い phosphate-buffered saline (PBS, PH 7.2) で30分間洗浄後、FITC-標識抗 HCA I, HCA II 抗体(10倍希釈, SIGMA 社製)を室温で40分間反応させ、PBS で洗浄後、PBS-glycerin buffer で封入し、Nikon-Fluophoto で観察した。

#### 2. 酵素化学的検出法

本法はCAの活性を溶液中の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SとCoとの反応によって証明するものである。Sugaiらによる、Hanssonらの改良法<sup>14)</sup>に習って施行した。ヒト正常表皮を採取後100%アセトン中で4°C、1時間以上浸漬固定し、8% sucrose in cacodylate buffer, pH 7.3, 4°Cにて洗浄後、

-70°Cで凍結した。凍結組織をTissue Tek II (Lab-Tek Products, Miles Laboratories, Naperville, IL) に包埋し、-30°Cのクリオスタットマイクロトームで厚さ4-6 $\mu$ m の切片を作成し、凍結しているうちに Millipore filter (0.25 $\mu$ m) にのせ、Hansson's medium (1.86 mM CoSO<sub>4</sub>, 55.9 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.73 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 158 mM NaHCO<sub>3</sub>) に浮遊させた。

酵素活性染色の概略は、以下のとおりである。まず、20 ml の蒸留水に 380 mg の炭酸ナトリウムを加え (A), 溶解した後に以下の溶液 (B) を 8.5 ml 加える。(B) は 0.1M CoSO<sub>4</sub> 5 ml, 0.53 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 ml, 0.067 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 ml, H<sub>2</sub>O 30 ml を混合した水溶液である。(A) に (B) を加えて 4 分間混和し、4 分間放置した後、1 分以内に反応を開始させた。4 分間から 7 分間反応させた後、ガラス棒で切片を移動させ、10% sucrose 水溶液で 20 秒間から 30 秒間洗浄し、次に 2% ammonium sulfide 溶液に 1 分間浸して反応を停止させた。その後、再度 10% sucrose 液で洗浄し、0.1% Fast Green にて対比染色した後、ethanol と xylane により脱水し、Entellan new, (Merck) で封入した。酵素活性阻害試験としては 1 $\times$ 10<sup>-5</sup>M Acetazolamide を使用した。

#### 3. 免疫組織化学的 in situ ハイブリダイゼーション法

in situ ハイブリダイゼーション法は、オリゴヌクレオチドプローブの標識物質として digoxigenin を使用して酵素抗体間接法にて発色させた。

##### a) DNA Probes

Applied Biosystems の DNA Synthetizer 391 A を用いて 100 base の合成 DNA を生成した。塩基配列は CA I, CA II 共に Sequence data (Genentec 社) を参照しそれぞれの 2nd EXON 5'端の 100 base を用いた。コントロールとして Action DNA を用いた。

DNA はランダムプライム法によって上記のオリゴヌクレオチドをテンプレートとして、digoxigenin 標識 deoxyuridine-triphosphate (Dig-

UTP) を標識した。目的 DNA へのハイブリッド形成後、ハイブリッドは酵素標識抗体 (抗 digoxigenin-alkaline phosphatase 標識) を使用した ELISA 法により、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (X-phosphate) と nitroblue tetrazolium salt (NBT) の発色反応によって検出された。その詳細を以下に示す。

DNA 標識には HCA I DNA, HCA II DNA, Action DNA のいずれかをテンプレートとして 0.3  $\mu\text{g}$  使用した。これらを 95°C で heat denaturing し、2  $\mu\text{l}$  の hexanucleotide 混合液、同量の dNTP labelling 混合液に滅菌蒸留水を加えて 19  $\mu\text{l}$  にしたのち 1  $\mu\text{l}$  の Klenof Enzyme を加え、37°C で 2 時間以上インキュベーションし digoxigenin-ヌクレオチドでラベルした。次に 2  $\mu\text{l}$  0.2 M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を停止させ、3  $\mu\text{l}$  LiCl (4 M) を加えて冷エタノールで沈澱させた。

#### b) In situ hybridization 法

##### (1) 組織の前処理

ヒト正常皮膚ブロックを 4% Parafolmaldehyde (PFA)/PBS (4°C, 2-6 時間) 及び、30% sucrose/0.02% diethylpyrocarbonate (DEP) (4°C) で浸漬固定した。充分固定され試料が沈んだら Tissue Tek II (O. C. T compound) に包埋し、切片作成まで -80°C で凍結した (2 時間以上)。

##### (2) In Situ Hybridization

固定した正常皮膚組織をクリオスタットマイクロトームで 5-6  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、脱脂とオートクレーブ処理したスライド上にとり、室温にて風乾した。

組織切片を PBS で洗浄し、室温で 20 分間の 0.2N HCl 処理により塩基性蛋白を除去し、5 分間 PBS で洗浄した。次に、37°C で 30 分間インキュベートし内因性 RNase を消化処理済みの 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protainase K 入り PBS で室温 10 分間消化処理した。次に、PBS で洗浄した後、4% (w/v) PFA/PBS で 5 分間固定し、PBS にて洗浄した後 Glycine にてクエンチング処理した。

ハイブリダイゼーション溶液 (40% formal-

dehyde, 0.6M NaCl, 1mM EDTA, 1  $\times$  Denhardt's solution, 10% Dextran Sulfate, 250u/ml human placenta RNase inhibitor, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  yeast t RNA, 10mM Tris HCl (pH 7.3) の probe DNA (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と carrier DNA (125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えて、35°C, 15 時間、スライドガラス上で緊縮条件下でハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後は SSC で洗浄した。

##### (3) 免疫学的検出

buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, 20°C) で簡単に洗浄した後、buffer 1 に 2% Normal Goat Serum 及び 0.3% TritonX-100 を加えた溶液 (buffer 2) にて室温で 30 分間インキュベーションした。次に buffer 1' にアルカリフォスファターゼラベル抗ジゴキシンゲン抗体が (1:500) になるまで加え、1 つのスライドにつき 50-100  $\mu\text{l}$  のせ、室温で 2 時間インキュベーションした後 buffer 1 で 15 分間、2 回洗浄し、未反応標識抗体を除去した。そして、buffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5 20°C) で 2 分間平衡化し、発色溶液 (45  $\mu\text{l}$  NBT, 35  $\mu\text{l}$  X-phosphate を 10 ml buffer 3 に加えた後、2.4 mg の levamisole と混合した溶液) をかけ、暗所で 4°C, 6 時間以上反応させた。充分に発色させた後、buffer 4 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) を用いて反応を停止させた。スライドは無水エタノール脱水し、エンテラン® で封入した。

## 結 果

### 1. HCA I, II のヒト正常皮膚組織における免疫学的局在

正常人皮膚を基質とした蛍光抗体直接法による検索を行った。HCA I, II は共に表皮に存在し、真皮では、血管壁や毛根、汗腺にも存在した。また、HCA II は HCA I よりも強く染色された。表皮では、角化細胞の細胞質や核周辺に存在した (Fig. 1 A, B)。

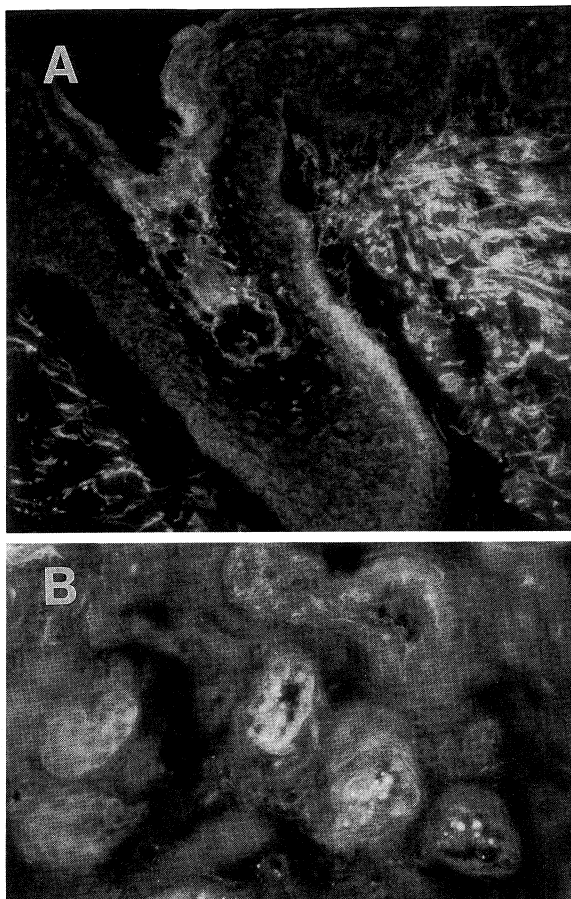


Fig. 1. A. Direct immunofluorescence method for the detection of HCA II. Positive staining can be seen on the epidermal cells, and strong, nonspecific halations were noted on the dermal collagenous fibers. (Original magnification  $\times 100$ )  
 B. Direct immunofluorescence method for the detection of HCA II. Dermal eccrine sweat glands (ducts) were finely stained. (Original magnification  $\times 100$ )

## 2. HCA I, IIのヒト正常皮膚組織における酵素組織化学的局在

Sugai らによる、Hansson らのコバルト重炭酸塩組織化学法の改良法を用いて、HCA のヒト正常皮膚組織における酵素活性より、その局在を検討した。酵素活性染色では、表皮基底層から有棘層にかけて強く染まった。表皮では、角化細胞の細胞質に認められ、部分的には細胞間にも認められた。真皮では、血管、汗腺に強く

反応した (Fig. 2)。また、特異的酵素疎外剤である Acetazolamide により酵素活性は消失した(not shown)。

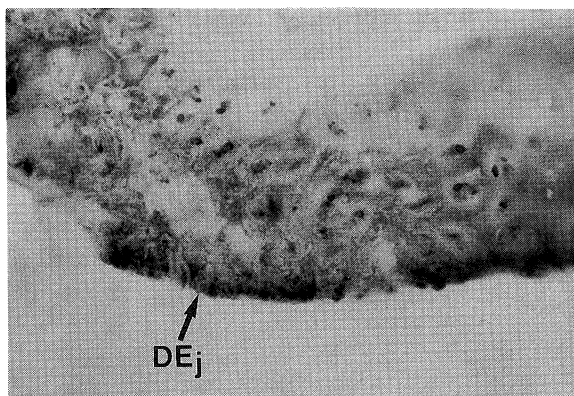
## 3. m-RNA レベルにおけるヒト正常皮膚組織の HCA I, IIの局在

Histo-in situ hybridization 法を用いて HCA I, II の m-RNA の検出を試みた。両者共に汗腺に強く認められ表皮細胞質内、及び核内にも m-RNA が認められた (Fig. 3)。また、真皮内では線維芽細胞と思われる細胞や、血管内皮細胞にも認められた。

## 考 察

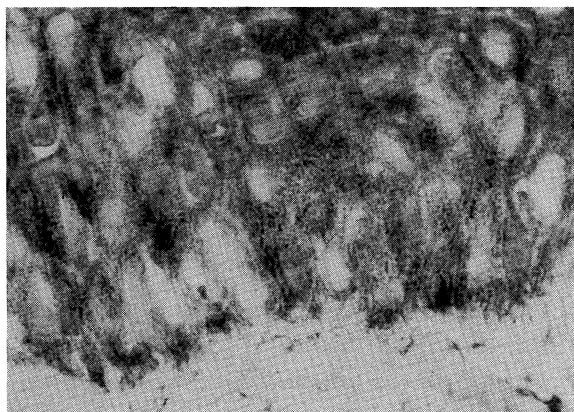
Carbonic anhydrase (CA) は約60年前に発見された亜鉛を含む金属酵素であるが、中でも CA I, II は赤血球を中心として広範囲な組織に存在することが知られている。腎尿管ではアンモニオンの排泄、ナトリウムイオンの再吸収に関与して尿の電解質組成、pH の調節を行うこと、また、胃壁細胞で、塩酸の産生に必要な水素イオンを産生することが知られている。現在まで、生体内の局在に関する研究は蛍光抗体法や、酵素抗体法、酵素化学的検出法等が用いられており腎臓、<sup>15-17</sup> 肝臓、<sup>17</sup> 胆嚢、<sup>17</sup> すい臓、<sup>17, 18</sup> 胃、<sup>14, 15, 17, 19</sup> 虫垂、<sup>16, 17</sup> 大腸、<sup>17</sup> 肺、気管支、<sup>17</sup> 唾液腺<sup>17</sup> 等の分泌細胞に関する報告がある。また、近年、骨格筋、<sup>20</sup> 脳、<sup>21-23</sup> 網膜<sup>23, 24</sup> についての報告もなされた。正常皮膚組織における CA の局在については、1955年に O. Broun - Falco らが Hansson's method (原法) を用いて表皮内のマルピギー層及び汗腺に豊富に認められることを報告しているのみである。<sup>11)</sup>

我々は、蛍光抗体法、組織化学的方法、免疫組織学的 in situ hybridization 法の3法を用いて、その局在を免疫学的、酵素活性、m-RNA レベルにおいて検討した。その結果、何れにお



**Fig. 2.** HCA enzyme activity was detected by the Hansson's cobalt bicarbonate histochemical method.

Reacted black grains can be seen on the epidermal cells. (Original magnification  $\times 200$ , DEj; dermo-epidermal junction) (Fast green was used for the counter staining.)



**Fig. 3.** Results of histo-in situ hybridization. Reacted digoxigenin-labeled nucleotide probes for HCA I were developed by the alkaline phosphatase staining. The reacted black (blue) grains were noted on the epidermal cells. (Original magnification  $\times 1,000$ )

いても CA I, II 共に汗腺に強く認められた。また、表皮ではマルピギー層を中心に細胞質内に認められ、真皮では主に血管内皮細胞に認められたが、線維芽細胞様の細胞にも存在した。それぞれの方法での分布はほぼ一致しており、O. Broun-Falco らの汗腺とマルピギー層を中心とした表皮細胞に認められるという結果とも一致している。さらに histo-in situ hybridization 法

により酵素活性のある部位に一致して CA の m-RNA が存在することが分かった。この事実は表皮細胞が CA を自ら生産していることを示しており極めて興味深いことである。また、生体内での分布に差のあることが知られている CA のアイソザイム (CA I, CA II) が共に表皮細胞にみられた。このように同一器官内で複数の炭酸脱水素酵素のアイソザイムの合成が証明されたことも本酵素の生物学的意義を検討する上で重要であろう。CA 陽性上皮細胞は高分子物質の分泌よりも細胞間の液体やイオンの輸送に関係すると言われている。特に汗腺において表皮内汗管よりも真皮内汗管、汗腺に豊富に認められることは CA が、汗腺におけるナトリウムイオンの再吸収に関与し、汗の酸度の調節、水分の能動的分泌をしていることを示唆している。

病体生理学的にみると CA II の機能的遺伝子欠損症例で、骨粗しょう症、腎尿細管性アシドーシス (RTA)、脳の石灰化などを伴うことが知られている。<sup>25)~28)</sup> これらはすべて生体内でのミネラルバランスの乱れが原因と考えられる。また、近年シェーグレン症候群や全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患患者血中にこの炭酸脱水素酵素に対する自己抗体が存在することが報告された。<sup>13)</sup> 両疾患ともにさまざまな全身症状を示すが、特に前者のシェーグレン症候群では前述の RTA や無汗症、乾燥性角膜炎、唾液分泌低下症などのさまざまな外分泌機能

異常を伴うことが特徴であり、それらはすべて炭酸脱水素酵素の機能阻害の症状として考えても矛盾がない。したがって、自己免疫疾患の外分泌機能異常症状を検討する上で全身的な CA の分布を明らかにする必要がある、今回、皮膚およびその付属器での酵素分布を検討した。

本酵素は、分子の中心に生体微量元素である亜鉛を抱合した起源の古い酵素の一つであり、生

命活動に極めて重要なものとされている。生体内微量元素である亜鉛の欠乏症として腸性肢端皮膚炎が知られているが、その代表的な症状である皮膚の剥落や強い粘膜の炎症は、この炭酸脱水素酵素の機能異常の結果とも考えられている。したがって、全身の皮膚や粘膜を広範に障害する病態を理解するためには、さらに、全身的な本酵素の分布の研究と、酸素機能の解析が

なされなければならないと考えている。

稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご校閲を賜った川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授に謹んで感謝いたします。また、同時に直接ご指導いただいた、同稲垣安紀講師に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(3-513, 2-505)、およびリディアオリリー研究助成会(平成3年度)の援助において行われたものである。

## 文 献

- 1) Coleman, J. E.: Carbonic anhydrase. *In* Inorganic Biochemistry, ed. by Eichhorn, G. L. 1st ed. Amsterdam, Elsevier Sci. Publish. 1973, p. 488
- 2) Lindskog, S., Henderson, L. E., Kannan, K. K., Liljas, A., Nyman, P. O. and Strandberg, B.: Carbonic anhydrase. *In* The Enzymes, ed. by Boyer, P. D. 5th ed. New York, Academic Press Inc. 1971, p. 587
- 3) Pocker, Y. and Sarkanen, S.: Carbonic anhydrase: Structure, catalytic versatility, and inhibition. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 149-247, 1978
- 4) Keilin, D. and Mann, T.: Direct perception of pigment in nerve tissue of human retina. *Nature* 144: 442, 1939.
- 5) Tashian, R. E.: The carbonic anhydrases: Widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays* 10: 186-192, 1989
- 6) Venta, P. J., Montgomery, J. C. and Tashan, R. E.: Isozymes. *Curr. Top. Biol. Med. Res.* 14: 59-72, 1987
- 7) Wistrand, P. J.: Properties of membrane-bound carbonic anhydrase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 429: 195-206, 1984
- 8) Storey, B. T., Dodgson, S. J. and Forster, R. E. II: The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 429: 210-211, 1984
- 9) Fernley, R. T., Wright, R. D. and Coghlan, J. P.: A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland. *FEBS Lett.* 105: 299-302, 1979
- 10) Fernley, P. T.: Non-cytoplasmic carbonic anhydrases. *TIBS* 13: 356-359, 1988
- 11) Braun-Falco, O. und Rathjens, B.: Über die histochemische Darstellung der Kohlensäure Anhydratase in normaler Haut. *Arch. Klin. Exper. Dermat.* 201: 73-82, 1955
- 12) Holger, P. and Hanson, J.: Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Histochem.* 11: 112-128, 1967
- 13) Inagaki, Y., Jinno-Yoshida, Y., Hamasaki, Y. and Ueki, H.: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J. Dermatol. Sci.* 2: 147-154, 1991
- 14) Sugai, N. and Ito, S.: Carbonic anhydrase, ultrastructural localization in the technique. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 511-525, 1980
- 15) Kumpulainen, T.: Human carbonic anhydrase isoenzyme C. *Histochem.* 72: 425-431, 1981
- 16) Jonas, L., Hoffman, L. and Serfling, D.: Der Nachweis von Carboanhydrase in menschlichen Niere unter dem Aspect der Saure-Basen-Regulation. *Z. Urol. Nephrol.* 76: 311-317, 1983
- 17) Spicer, S. S., Sens, M. A. and Tashian, R. E.: Immunocytochemical demonstration of carbonic

- anhydrase in human epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 30 : 864—873, 1982
- 18) Kumpulainen, T. and Jalovara, P. : Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in the human pancreas. *Gastroenterology* 80 : 796—799, 1981
  - 19) Kumpulainen, T. : Immunohistochemical Localization of human carbonic anhydrase isoenzyme C. *Histochem.* 62 : 271—280, 1979
  - 20) Shima, K., Tashiro, K., Hibi, N., Tsukada, Y. and Hirai, H. : Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 59 : 237—239, 1983
  - 21) Kumpulainen, T. and Korhonen, L. K. : Immunohistochemical demonstration of carbonic anhydrase. *Histochem.* 58 : 397—405, 1978
  - 22) Kumpulainen, T. and Nystrom, N. H. M. : Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme C in human brain. *Brain Res.* 220 : 220—225, 1981
  - 23) Kumpulainen, T., Dahl, D., Lorhonen, L. K. and Nystrom, S. H. M. : Immunolabeling of carbonic anhydrase isoenzyme C and fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina. *J. Histochem. Cytochem.* 31 : 879—886, 1983
  - 24) Kumpulainen, T. : Carbonic anhydrase isoenzyme C in the human retina. An immunohistochemical study. *Acta Ophthalmol. (Kbh)* 58 : 397—405, 1980
  - 25) Shapira, E., Ben Yoseph, Y., Eyal, F. G. and Russell, A. : Enzymatically inactive red cell carbonic anhydrase B in a family with renal tubular acidosis. *J. Clin. Invest.* 53 : 59—63, 1974
  - 26) Sly, W. S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M. P., Yu Y. S. L. and Tashan, R. E. : Carbonic anhydrase II deficiency as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 : 2752—2756, 1983
  - 27) Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Dodgeson, S. J., Forster, R. E. II and Sly, W. S. : The value of inherited deficiencies of human carbonic anhydrase isozymes in understanding their cellular roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 429 : 262—275, 1984a
  - 28) Sly, W. S., Whyte, M. P., Sundaram, V., Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D. and Guibaud, P. : Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N. Engl. J. Med.* 313 : 139—145, 1985