

34kDa EDTA-extractable protein (EEP34k) の精製, 生理活性及び免疫学的検討 (図11, 表1)

太田 厚子*・大坂 幸英*・中山 龍子* (*秋田大学医学部眼科学教室)
小林 良二**・櫻木 章三* (**秋田大学医学部第2生化学教室)

Biochemical and Immunological Properties of 34KDa EDTA-extractable Protein (EEP34k)

Atsuko Ohta, Kouei Ohsaka, Ryuko Nakayama

Ryoji Kobayashi* and Shozo Sakuragi

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

**Department of Biochemistry, Akita University School of Medicine*

要 約

EDTA-extractable protein (EEP) は水晶体膜の主要構成蛋白の一つであり, SDS 電気泳動上約34kDa (EEP34k) と約32kDa (EEP32k) のバンドとして検出される。既に, 我々は phospholipase A₂ 阻害蛋白である lipocortin と EEP34k が類同の蛋白であることを報告した。本研究では, EEP34k を陰イオン交換クロマトグラフィーにより, 非吸着画分 (34k (A)) と, 吸着され約0.2MNaCl によって溶出される画分 (34k (B)) との二つの画分に分離して検討した。34k (A), 34k (B) は共に, Ca⁺⁺ に依存したアクチン結合性, リン脂質結合性を示し, 免疫学的には34k (A), 34k (B) は共に lipocortin I 及び II 抗体と反応し免疫学的交差性を示した。34k (A) のアミノ酸分析結果はヒト胎盤 lipocortin と類似していた。従って EEP34k には等電点の異なる2種以上の isoprotein が存在し, いずれも phospholipase A₂ 阻害活性を有することなどからも一連の lipocortin 群に属するタンパクであることが判った。(日眼 92: 2071—2079, 1988)

キーワード: EDTA-extractable protein (EEP), リボコルチン, F-アクチン, リン脂質

Abstract

EDTA-extractable protein (EEP) is known to be a major lens membrane protein with a molecular weight ranging from 32kDa to 35kDa, and is also known to bind to the lens membrane in a calcium dependent manner. It has been revealed that the 34kDa protein of EEP (EEP34k) cross-reacted with antibody prepared against lipocortin, an inhibitor of phospholipase A₂. On ion-exchange chromatography we purified two proteins from EEP34k. One of them, which we designated as 34k (A), passed through a column of Q-Sepharose, and the other 34k (B) was eluted by application of a linear NaCl concentration gradient (0~0.2M). Both 34k (A) and 34k (B) were bound to phospholipids and F-actin in a calcium dependent fashion. On Western-blot analysis, two proteins showed cross-reactivity to lipocortin I and lipocortin II. In conclusion, EEP34k consists of two or more protein components with different isoelectric points and these proteins may represent one of a family of lipocortins. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 2071—2079, 1988)

別刷請求先: 010 秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 太田 厚子

(昭和63年7月28日受付, 昭和63年9月8日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuko Ohta, M.D. Dept. of Ophthalmol., Akita Univ. School of Med.
1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan

(Received July 28, 1988 and accepted in revised form September 8, 1988)

Key words: EDTA-extractable protein (EEP), Lipocortin, Phospholipid, F-actin

I 緒 言

EDTA-extractable protein (EEP) は Main intrinsic protein (MIP) と共に、水晶体膜タンパクの主要構成成分のひとつであり、SDS 電気泳動上、約34kDa (EEP34k), 約32kDa (EEP32k) のバンドとして検出される。EEP は全膜タンパクの約1~5%を占め¹⁾²⁾ Ca^{++} イオンによって膜と結合し Ca^{++} をキレートすると遊離してくる表在性タンパク質 (extrinsic protein) であり^{1)3)~5)}, MIP と異なって上皮細胞, 繊維細胞いずれにも存在することが確認されている⁶⁾。EEP は, ウシ, ブタ, ヒツジ, サルなどの哺乳類はもちろん, トリのレンズにも存在する²⁾⁷⁾がヒトのレンズではまだこのタンパクは検出されていない⁸⁾。第91回日本眼科学会において当教室の高橋らは EEP と phospholipase A_2 阻害タンパクである lipocortin が免疫学的に類同のタンパクであることを発表した⁹⁾。ほぼ、同

時期に, Russell らにより, EEP35kDa タンパクが lipocortin と同一であるとの報告がなされた¹⁰⁾。Lipocortin は1980年, Flower と Di Rosa らによりマクロコルチン¹¹⁾, 平田らによりリボモジュリン¹²⁾, Russo-Marrie らによりレノコルチン¹³⁾という名称で報告されたタンパクである。Phospholipase A_2 を阻害し, アラキドン酸の遊離を抑制し, 結果としてプロスタグランジンなどの炎症メディエーターの生合成を抑える抗炎症タンパクである。グルココルチコイドによりその生合成が誘導されることから, グルココルチコイドの抗炎症作用は lipocortin を介していると推測されている。その後 Huang らはヒト胎盤より2つの phospholipase A_2 inhibitor を精製し, これを lipocortin I, II とした¹⁴⁾。Lipocortin I, II はアミノ酸配列上約50%の相同性がありほぼ同等の phospholipase A_2 阻害活性を有する。Lipocortin I が EGF-receptor/kinase の基質であり, Lipocortin II が Rous 肉腫ウイ

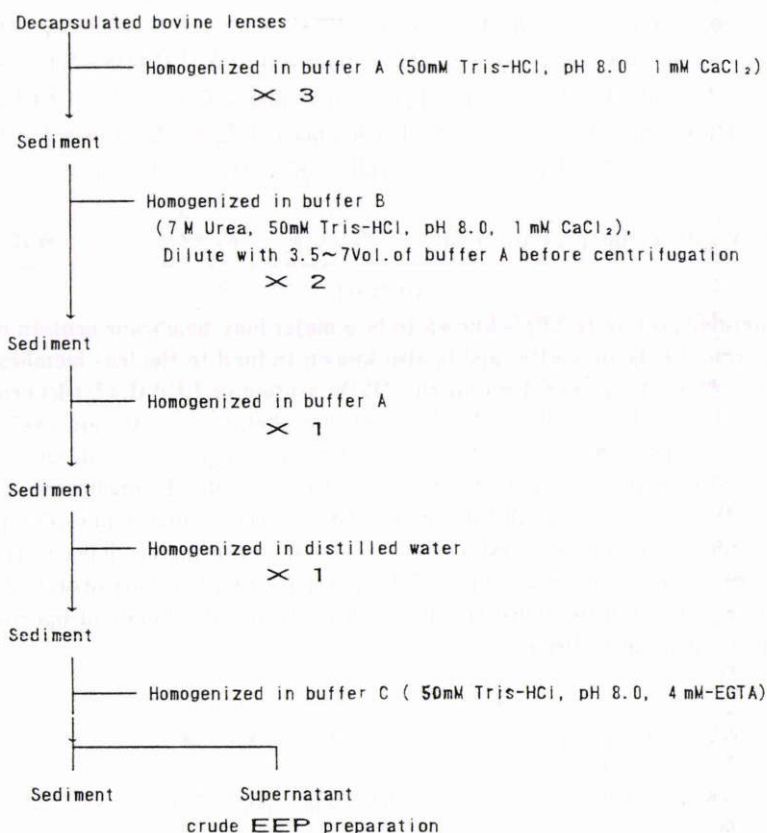


図1 EEP抽出法

ルスのがん遺伝子産物 p60src tyrosine-kinase の基質である p36 と同じものであることも明らかにされている¹⁴⁾。一方, Gerke & Weber, Glenney らにより発見されたタンパク, p36 は Ca^{++} 依存性に actin と結合するタンパクであることから Calpactin と命名されたが¹⁵⁾¹⁶⁾, その DNA sequence により, calpactin I と lipocortin II, calpactin II と lipocortin I とが各々相同のものであることが明らかとなっている¹⁷⁾。本研究では, 抗 lipocortin I 及び II 抗体, 抗 EEP34k 抗体を作成し, 各々について免疫学的検討をおこなった。また, EEP34k を精製しその生理活性, 特に Ca^{++} 存在下でのアクチン結合性, リン脂質との結合性等につき検討した。

II 実験方法

1) EEP34k の抽出と精製

成牛より摘出した水晶体, 約500個を1回の抽出, 精製の材料として用いた。

図1の方法に従い抽出された Crude EEP を透析, 凍結乾燥し bufferD (10mM Tris-HCl pH 7.5) に溶解後, bufferD にて平衡化した Q-sepharose column にかける。約200ml の bufferD で洗浄後, 0~0.7M NaCl の linear gradient でタンパクを溶出した。各フラクションを SDS/PAGE にて確認後, 必要なフラクションを回収した。EEP34k は非吸着画分 (EEP34k (A)) と約0.2M NaCl で溶出される画分 (EEP34k (B)) とに回収された。

2) F-actin との結合実験

家兎背筋より Spudich & Watt 法¹⁸⁾によって精製した G-actin 33 μ g と, EEP34k (A), EEP34k (B) 15 μ g とを各々 bufferE (100mM KCl, 1mM MgCl_2 , 5mM mercaptoethanol, 0.2mM ATP, 5mM Tris-HCl, pH 7.5) 中で重合させた。Buffer 中には EGTA (E) または CaCl_2 (C) を終濃度1mM となる様に加え総容量を175 μ l とした。25 $^{\circ}\text{C}$ 1時間重合させた後約100,000 $\times$ g, 20分間, 遠心し上清 (S) と沈澱 (P) に含まれるタンパクを SDS/PAGE によって分析した。

3) Phospholipids containing liposome との結合実験

Liposome 液50 μ l に EEP34k (A), EEP34k (B) 15 μ l とを各々 bufferF (2mM MgCl_2 , 50mM Tris-HCl, pH 7.5) 中に混合させ, 更に EGTA (E) または CaCl_2 (C) を終濃度1mM となる様に加え総容量を175 μ l とした。また, 同様に cholesterol (1) 及び各種リン脂質 (2,

phosphatidylserine (p.s.), 3, phosphatidylinositol (p.i.), 4, phosphatidylcholine (p.c.), 5, phosphatidylethanolamine (p.e.)) を含む liposome 液をそれぞれ EEP34k (A), 34k (B) 中に混合させ CaCl_2 を終濃度1mM となる様に加えた。25 $^{\circ}\text{C}$ 1時間重合させた後約100,000 $\times$ g, 20分間の遠心により上清 (S) と沈澱 (P) とにわけそれぞれ SDS/PAGE によって分析した。

4) 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS/PAGE) は Laemmli の方法によった¹⁹⁾。二次元電気泳動は O'Farrell の方法に従って行った²⁰⁾。一次元目は等電点分離を行い (NEpHGE), 二次元目に SDS/PAGE を行った。

5) 免疫学的交差性

抗ヒト胎盤 lipocortin I 抗体, 抗ヒト胎盤 lipocortin II 抗体及び抗 EEP34k (A) 抗体に対する交差性を検討した。抗 EEP34k (A) 抗体の作成は次の様に行った。

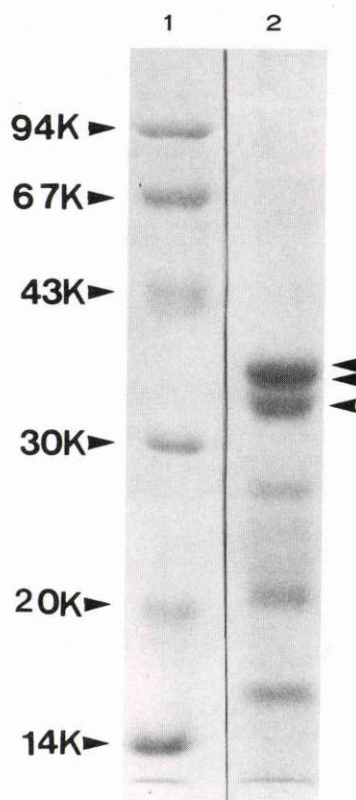


図2 Crude EEP の SDS 電気泳動パターンを示す。
1: Molecular weight standard 2: Bovine lens EEP

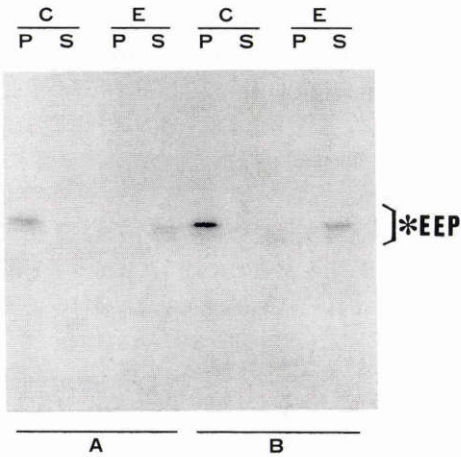


図6 リン脂質を含むリボゾームと EEP34k(A), 34k(B) を buffer (2mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7.5) 中で混合させ, EGTA (E) または CaCl₂ (C) を終濃度1mM となるよう加えた, 25℃, 30分間 incubation 後約100,000×g, 20分間の遠心により上清 (S) と沈澱 (P) に分け各々を SDS/PAGE で分析した. Ca⁺⁺存在下ではリボゾームと結合した EEP 34k(A), 34k(B) は沈澱 (P) に検出されたが, EGTA 下では沈澱(P)にはほとんど検出されなかった.

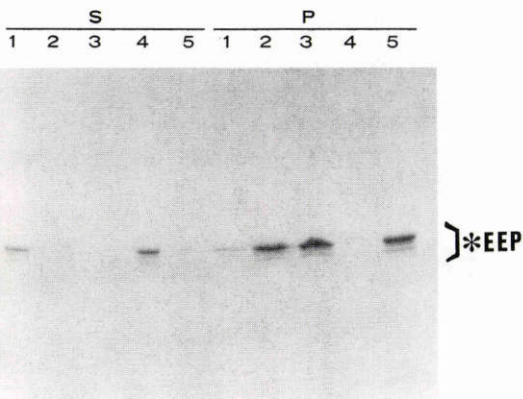


図7 EEP34k (A) と各種リン脂質 (1. cholesterol, 2. phosphatidylserine, 3. phosphatidylinositol, 4. phosphatidylcholine, 5. phosphatidylethanolamine) を buffer (2mM MgCl₂ and 50mM Tris-HCl pH 7.5) 中で混合し CaCl₂ を終濃度1mM となるようくわえる, 25℃, 30分間 incubation した後, 100,000×g, 20分間遠心し沈澱 (P), 上清 (S) を各々SDS/PAGE で分析した. Ca⁺⁺存在下で EEP34k (A) は (2, 3, 5) のリン脂質と結合し (P) に検出されるが (1, 4) のリン脂質とは結合しない.

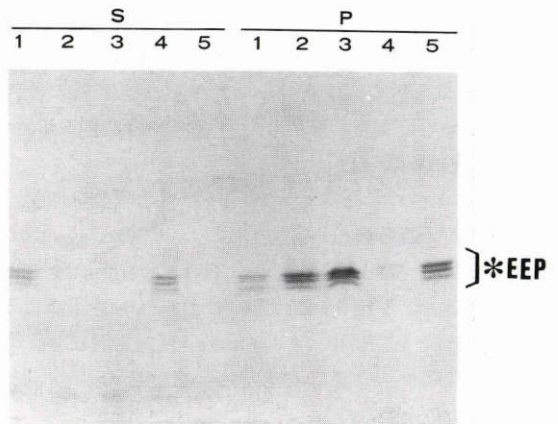


図8 EEP34k (B) と各種リン脂質 (1. cholesterol, 2. phosphatidylserine, 3. phosphatidylinositol, 4. phosphatidylcholine, 5. phosphatidylethanolamine) を buffer (2mM MgCl₂ and 50mM Tris-HCl pH 7.5) 中で混合し CaCl₂ を終濃度1mM となるようくわえる, 25℃, 30分間 incubation した後, 100,000×g, 20分間遠心し沈澱 (P), 上清 (S) を各々SDS/PAGE で分析した. Ca⁺⁺存在下で EEP34k (B) は (2, 3, 5) のリン脂質と結合し (P) に検出されるが (1, 4) のリン脂質とは結合しない.

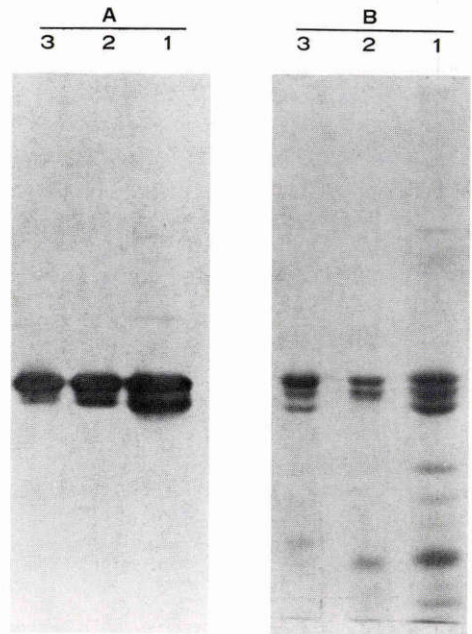


図9 各々のタンパクを SDS/PAGE により泳動後, ニトロセルロース膜に転写した. ニトロセルロース膜を抗ヒト胎盤リボコルチン I 抗体にて 1 時間反応後, ペルオキシダーゼをラベルした第二抗体で発色させた. A: immune gel replicate, B: coomassie blue staining, 1: Crude EEP, 2: EEP34k (A), 3: EEP34k (B)

陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製後、凍結乾燥した EEP34k(A) を分取用 SDS/PAGE で分画した。Gel より切出し、抽出したものを白色家兎に免疫し、得られた抗血清を使用した。Western-blot は Towbin の方法に従って行い²¹⁾、第二抗体はペルオキシダーゼをラベルした抗ウサギ IgG 抗体を使用した。

6) アミノ酸分析

1) の方法で抽出、精製し更に Hydroxylapatite chromatography, Ultragel AcA54 によるゲル濾過によって精製した EEP34k (A) の sample を 6N HCl 中で 110°C 2 時間加水分解し Beckmann 6300E amino acid analyzer で分析した。

III 結 果

1) EEP 及び lipocortin の抽出、精製

図 2 に Crude EEP の SDS/PAGE パターンを示す。左側の分子量マーカーの 30,000 と 43,000 の間に EEP は 3 本のバンドとして得られ、分子量は上から約 35

kDa, 34kDa, 32kDa と推定される。

図 3 には EEP の Q-sepharose chromatography による elution pattern を示した。EEP34k は非吸着画分 (34k (A)) と、吸着され約 0.2M NaCl によって溶出される画分 (34k (B)) との二つの画分に分離された。

2) 二次元電気泳動

図 4 に二次元電気泳動の結果を示した。図 4C は 34k (A) と 34k (B) とを混合して行ったスポットを図式化したものであり、○は 34k (A) 由来、●は 34k (B) 由来のスポットを示している。34k (A) は 34k (B) に比し僅かに高い等電点を示しており、陰イオン交換クロマトグラフィーの結果と一致した。また、34k (B) は少なくとも二つ以上の等電点を有していた。

3) F-actin との結合性

図 5 に示すように、34k (A)、34k (B)、共に Ca^{++} 存在下 (C) では F-actin と共に沈澱 (P) に検出され、EGTA 存在下 (E) ではアクチンは沈澱に検出されるものの、34k (A)、34k (B)、は上清に検出された。従っ

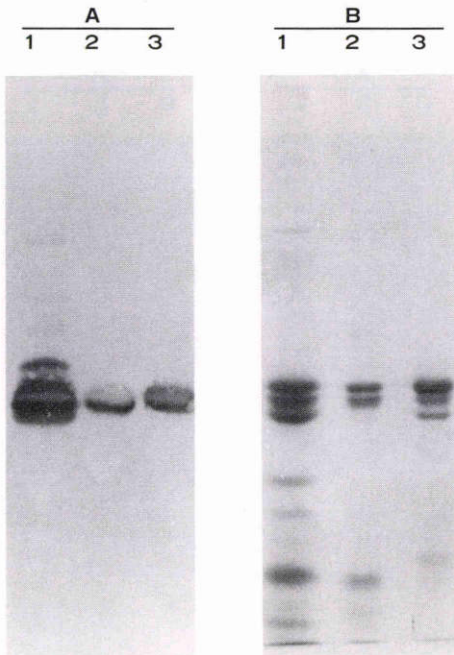


図10 各々のタンパクを SDS/PAGE により泳動後、ニトロセルロースに膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗ヒト胎盤リボコルチン II 抗体にて 1 時間反応後、ペルオキシダーゼをラベルした第二抗体で発色させた。A: immune gel replicate, B: coomassie blue staining, 1: Crude EEP, 2: EEP34k (A), 3: EEP34k (B)

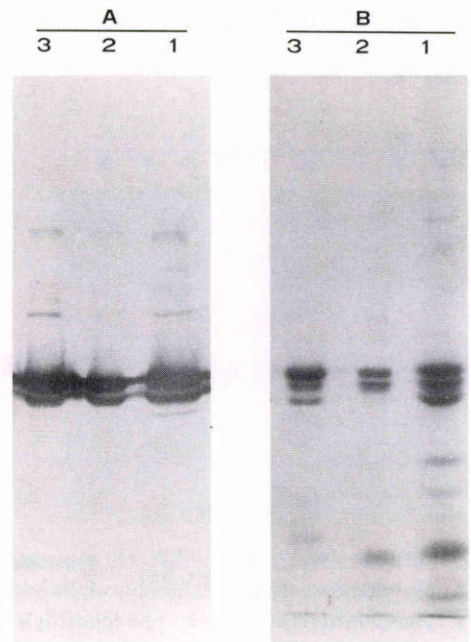


図11 各々のタンパクを SDS/PAGE により泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 EEP34k (A) 抗体にて 1 時間反応後、ペルオキシダーゼをラベルした第二抗体で発色させた。A: immune gel replicate, B: coomassie blue staining, 1: Crude EEP, 2: EEP34k (A), 3: EEP34k (B)

表1 Amino acid composition of bovine lens EEP and human placenta lipocortin

Amino acid	lipocortin II	EEP
Asp	12.55	11.05
Thr	6.08	4.91
Ser	3.63	4.18
Glu	9.98	12.22
Pro	2.07	2.54
Gly	6.77	6.40
Ala	9.78	8.24
Cys	0.00	0.35
Val	5.45	5.81
Met	1.97	2.38
Ile	6.70	6.35
Leu	11.59	10.97
Tyr	2.72	4.45
Phe	3.17	2.48
His	1.81	1.56
Trp	n. d.	n.d.
Lys	10.03	9.94
Arg	5.68	6.14

Sample of EEP were hydrolyzed in 6N HCl for 24 hours at 110°C and amino acid composition of EEP was determined by Beckmann 6300E amino acid analyzer.

て34k (A), 34k (B), 共にF-actinとCa⁺⁺依存性に結合すると考えられた。

4) リン脂質との結合性

図6には34k(A), 34k(B)各々と混合リボゾームとの結合性を示した。両者共に、Ca⁺⁺存在下(C)ではliposomeと結合して沈澱中に検出されたが、EGTA存在下(E)では結合せず上清(S)に検出された。また、Ca⁺⁺存在下での単独リボゾームとの結合実験(図7, 8)では(A), (B)共にP.S., P.I., P.E.と結合し、P.C., Cholesterolとは両者共に結合しなかった。

5) 免疫学的交差性(図9~11)

免疫学的に、34k (A), 34k (B)は共に抗ヒト胎盤lipocortin I及びII抗体と反応し免疫学的交差性を示した。また、今回作製した抗34k(A)抗体に対しては、34k (B)も同様に反応を示した。

6) アミノ酸分析(表1)

34k (A)は、ヒト胎盤lipocortin IIと類似したアミノ酸組成であった。

IV 考 按

EEPに関してはこれまでに、Broekhuysenらのグ

ループを中心に報告がなされているが、粗EEP分画を用いた研究がほとんどで、各コンポーネントを分離、精製しての生物活性、化学的検討はなされていない。今回、我々はEEP34kDaを抽出精製し、陰イオン交換クロマトグラフィーによって更に34k (A), 34k (B)に分けて検討した。34k (A), 34k (B)は互いに等電点が異なり更に34k (B)には少なくとも2種以上の等電点variantが存在していた。しかし、34k (A)と34k (B)は、F-actinやphospholipidとの結合性においては同一の態度を示し、やはりCa⁺⁺依存性であった。EEPとphospholipidとの結合性に関しては、Ca⁺⁺存在下ではphosphatidylserine, phosphatidylinositol, 及びphosphatidylethanolamineとは結合するが、phosphatidylcholine, 及びsphingomyelinとは結合しない²²⁾との報告があり今回の我々のデータとほぼ一致した。EEPとphospholipidのCa⁺⁺存在下での結合性がどのような意味を持っているのかに関しては様々な推測がなされている。現在のところレンズ繊維膜におけるphospholipidの局在の詳細は不明であるが²²⁾、細胞膜phospholipidとEEPとのinteractionにおいては、Ca⁺⁺は両者の陰イオン間のbridgeイオンとして働いていると考えられている。Ca⁺⁺との親和性は、各々のphospholipidのchargeによって異なるため、EEPとの結合性にも相違がでるものと思われる。更にF-actinとの結合性は細胞膜と細胞骨格との間の連結因子としてのEEPの機能を推測させるものである。

免疫学的には、34k (A), 34k (B), 共に抗ヒト胎盤lipocortin I, II抗体に対して反応を示した。また、今回作製した抗34k (A)抗体との免疫学的交差性の検討では34k (A)はむろん、34k (B)とも同様に反応を示した。これらの結果から34k (A), 34k (B)は共にlipocortin I, IIの混在物である可能性、あるいは、lipocortin I, IIのいずれの抗原決定基をも有する第三のlipocortinである可能性が考えられる。最終的な結論をくだすためには今回の免疫学的検討や等電点の差異の検出に加え、一次配列の決定を含め更に詳細な検討が必要であろう。他臓器より精製されたlipocortinの生理活性についてはCa⁺⁺依存性にphospholipid, F-actinと結合し、また、Ca⁺⁺存在下ではphosphatidylserine, phosphatidylinositolと結合するとの報告がある¹⁷⁾。Ca⁺⁺存在下でのphospholipidやF-actinとの結合性もlipocortin I, IIと34k (A), 34k (B)とに共通な性格であり、アミノ酸分析の結果からも両者は酷似していた。更にEEP34k(A), 34k(B)

は共に lipocortin I, II と同等の phospholipase A₂ 阻害活性を有すること(未発表データ)から, EEP34k は 2 ~ 3 種のタンパクの混合物であり, いずれも一連の lipocortin 群に属するタンパクであることが判明した。

EEP の組織における局在については, Broekhuysen らの報告によれば, 網膜 Müller 細胞, 内皮細胞, ある種の上皮細胞に存在しているといわれている⁸⁾。今回, 組織学的検討は行っていないが, EEP がレンズにおいてどのような機能を担っているかなども含め, 免疫組織学的検討も加えていく必要があると思われる。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会(昭和63年3月, 京都)学術展示において発表した。

文 献

- 1) Broekhuysen RM, Kuhlmann ED: Membranes IV. Preparative isolation and characterization of membranes and various membrane proteins from calf lens. *Exp Eye Res* 26: 305—320, 1978.
- 2) Bouman AA, de Leeuw ALM, Broekhuysen RM: Lens membranes XIII. Comparative study of biochemical characteristics of the fiber membrane polypeptides from bovine, pig, sheep and chicken lenses. *Exp Eye Res* 32: 491—500, 1981.
- 3) Bouman AA, de Leeuw ALM, Tolhuizen EF, et al: Lens membranes VI. Some characteristics of the EDTA-extractable protein (EEP) from bovine lens fiber membranes. *Exp Eye Res* 29: 83—93, 1979.
- 4) Van Raaij AJM, de Leeuw ALM, Broekhuysen RM: Calcium-dependent binding of EDTA-extractable proteins to calf lens fiber membrane structures. *Biochimica et Biophysica Acta* 736: 67—72, 1983.
- 5) Van Raaij AJM, de Leeuw ALM, Broekhuysen RM: In vitro reassociation of EDTA-extractable proteins with calf lens fiber membranes. *Exp Eye Res* 40: 327—334, 1985.
- 6) Vermorken AJM, Hilderink JMHC, et al: Changes in membrane protein pattern in relation to lens cell differentiation. *FEBS Lett* 83: 301, 1977.
- 7) Bouman AA, Broekhuysen RM: Lens membranes XIV. Comparative study of immunological characteristics of the fiber membrane polypeptides from calf, pig, sheep and chicken lenses. *Exp Eye Res* 32: 299—308, 1981.
- 8) Bouman AA, de Leeuw ALM, Kuhlmann ED,

- et al: Lens membranes XV. Comparative study of membrane and cytoplasmic proteins from human, monkey and other animal lenses. *Exp Eye Res* 33: 309—314, 1981.
- 9) 高橋久志, 中山龍子: EEP34k-kilo dalton protein (p34) に関する研究. 第91回日眼総会講演抄録集, 166, 1987.
- 10) Russell P, Zelenka P, Martensen T, et al: Identification of the EDTA-extractable protein in lens as calpactin. I. *Curr. Eye Res* 6: 533—538, 1987.
- 11) Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, et al: Macroscortin: A polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature* 287: 147—149, 1980.
- 12) Hirata F, Schiffman E, Venkatasubramanian K, et al: A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci* 77: 2533—2536, 1980.
- 13) Russo-Marie F, Dural D: Dexamethasone-induced inhibition of prostaglandin production does not result from a direct action on phospholipase activities but is mediated through a steroid-inducible factor. *Biochim Biophys Acta* 712: 177—185, 1982.
- 14) Huang KS, Pepinsky RB, et al: Two human 35 kd inhibitors of phospholipase A₂ are related to substrates of pp60v-src and of the epidermal growth factor receptor/kinase. *Cell* 46: 191—199, 1986.
- 15) Gerke V, Weber K: Identity of p36k phosphorylated upon rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO Jour* 3: 227—233, 1984.
- 16) Glenney J: Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca⁺⁺-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4258—4262, 1986.
- 17) Saris CJM, Hunter T, et al: The cDNA sequence for the protein-tyrosine kinase substrate p36 (calpactin I heavy chain) reveals a multidomain protein with internal repeats. *Cell* 46: 201—212, 1986.
- 18) Spudich JA, Watt S: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J Biol Chem* 246: 4866—4871, 1971.
- 19) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio-

- phage T4. *Nature* 227 : 680—685, 1970.
- 20) **O'Farrel PH** : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250 : 4007—4021, 1975.
- 21) **Towbin H, Saehelin T, Gordon J** : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitro-cellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76 : 4350—4354, 1979.
- 22) **van Raaij AJM, de Leeuw ALM, Broekhuijsen RM** : Complex formation of EDTA-extractable proteins from calf lens fiber membranes with calcium and acidic phospholipids. *Exp Eye Res* 40 : 477—487, 1985.
-