EEP 32 kd protein の精製，生理活性及び免疫学的検討 (図14)

中山 龍子・太田 厚子・大坂 幸英 (秋田大学医学部眼科学教室)
小林 良二*・桜木 章三 (*秋田大学医学部第二生化学教室)

要 約

EDTA-extractable protein (EEP) は main intrinsic protein (MIP) とともに水晶体膜タンパクの主要構成成分であり，SDS-電気泳動上，分子量が34-kilodalton (EEP34) と32-kilodalton (EEP32) の二つのバンドに分離される．既に我々は，粗 EEP を用いて，EEP34がホスホリパーゼ A_2 阻害タンパクであるリポコルチンと同一のタンパクであることを免疫学的交差性から明らかにした[1]．今回，著者は EEP のもう一つの成分である EEP32について検討を行った．粗 EEP を Q-セファロースにかけると，EEP32は0.1～0.25M NaCl で溶出される画分 (EEP32-A) と0.35～0.4M NaCl で溶出される画分 (EEP32-B) に分離された．両者はともにリポコルチンと同様のカルシウム依存性のアクチン結合性，リン脂質結合性を有していた．更に EEP32 の主成分である EEP32-A には，リポコルチン I より強いホスホリパーゼ A_2 阻害活性が認められ，EEP32-A がリポコルチン類同タンパクであることが判った．また，EEP32-A は胎盤のリポコルチン類同タンパクと免疫学的交差性が認められなかったが，EEP32-B は交差性を有していたことより，EEP32には等電点と抗原性を異にする二種のリポコルチン類同タンパクが存在することが示唆された．(日眼会誌 93：540—552, 1989)

キーワード：EEP，リポコルチン，クロマトグラフィー，ホスホリパーゼ A_2 阻害活性，イムノ・ブロット

Biochemical and Immunological Properties of EEP 32 kd protein

Ryuko Nakayama, Atsuko Ohta, Kouei Ohsaka, Ryoji Kobayashi* and Shozo Sakuragi

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

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

Abstract

EDTA-extractable protein (EEP) is a major extrinsic protein of lens membrane. EEP is composed of two major polypeptides on SDS-PAGE with apparent molecular weights of 32 kilodaltons (kd) and 34 kd. Recently it has been reported that the 34 kd protein of the EEP cross-reacted with the antibody prepared against lipocortin, an inhibitor of phospholipase A_2. We have purified and characterized the 32 kd protein of the EEP (EEP 32). Crude EEP of bovine lens was applied to a Q-Sepharose column and eluted with a linear gradient system composed of 0～0.7M NaCl. The EEP 32 was discreted at salt concentrations of approximately 0.1～0.25M (EEP 32-A) and 0.35～0.4M (EEP 32-B). Both EEP 32-A and EEP 32-B interact with phospholipid and F-actin in a Ca^{2+}-dependent manner as lipocortin. Futhermore, the EEP 32-A, a major component of the EEP 32 purified by hydroxyapatite chromato-

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 中山 龍子
(平成元年2月28日受付，平成元年4月3日改訂受理)
Reprint requests to: Ryuko Nakayama, M.D. Dept. of Ophthalmol., Akita Univ. School of Med. 1-11 Hondo, Akita 010, Japan
(Received February 28, 1989 and accepted in revised form April 3, 1989)

graphy and gel filtration, inhibited phospholipase A_2 activity more than lipocortin. On Western blot analysis, the 32 kd lipocortin-like protein of human placenta showed cross-reactivity to EEP32-B, but not EEP32-A. These results suggest that EEP32 contains two lipocortin-like proteins differing in antigenicity and isoelectric points. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 540—552, 1989)

Key words: EEP, Lipocortin, Chromatography, Inhibition of phospholipase A_2 activity, Western blot

I 緒 言

水晶体膜タンパクには二種のタンパク群すなわちmain intrinsic protein（MIP）とEDTA extractable protein(EEP)が報告されている[2]が，このうち，MIPは膜タンパクの約50%を占め，Gap junctionの主要構成タンパクであることが判明している[3]．一方，EDTAないしEGTAによって可溶化される周辺タンパクであるEEPは，膜タンパクの1～5%を占め[4][5]，これまでに，ウシ，ヒツジ，ブタ，サルといった哺乳類[4][6][7]や，鳥類[4][6]にもその存在が確認されている．哺乳類のEEPには，SDS電気泳動上，34-kilodaltonと32-kilodalton（以下kdと略す）の二つのバンドが検出され，カルシウム依存性に細胞膜のリン脂質に結合すること[8]や，protein kinase Cによりリン酸化を受ける[9]といった生化学的性質が明らかにされている．最近，EEPの34 kd成分（以下，EEP34と略す）はリポコルチンそのものであることが，抗リポコルチン抗体を用いて明らかにされた[1][10]が，もう一つの成分である32kdタンパク（以下，EEP32と略す）については，分離精製や物理化学的性質の検討は行われていない．またその生理機能についても解明されていない．

リポコルチンはステロイド刺激によりその生合成が誘導されるホスホリパーゼA_2阻害タンパクである．リン脂質からのアラキドン酸の遊離を抑制し，その結果，プロスタグランジンやロイコトリエンの生合成を抑え，抗炎症作用を発揮すると言われている．Huangらは，ヒト胎盤よりホスホリパーゼA_2阻害活性を有し，アミノ酸配列上，50%の相同性を示す二つの35kdタンパクを精製し，リポコルチンI，IIとした[11]．ペプチド・マッピング，cDNA sequenceからのアミノ酸配列の決定により，リポコルチンIは，Glennyらが報告していたカルシウム依存性にリン脂質とアクチンに結合するタンパクであるカルパクチンのうちのカルパクチンIIと，一方リポコルチンIIは，カルパクチンI，WeberらのProtein Iと同一タンパクであること[11)~15)]が明らかとなった．

リポコルチンと同様に，カルシウム依存性にリン脂質，アクチンに結合するタンパクは，異なる動物種の組織，細胞に存在し，ブタ小腸上皮(Protein I=36kd, Protein II=32kd)[16)~18)]，ブタ肝（Protein II=32kd, Protein III=70kd)[16)18)]，電気ウナギの電気器官（カルエレクトリン=32kd, 36kd, 70kd)[19~22)]，人リンパ球(28kd, 35kd, 68kd)[23)]，ニワトリ砂嚢(カルシメジン=33kd, 35kd, 67kd)[24)]ウシ肝（エンドネキシン=32.5 kd)[25)]において認められている．このうち，分子量が34 kd前後のタンパクはリポコルチンそのものであり，分子量が32kd前後と68kd前後のタンパクは，リポコルチンと同様の生理活性を有するリポコルチン類同タンパクと考えられている．

今回，著者は抽出性，カルシウム依存性の細胞膜との結合性，分子量の類似性より，EEP32はリポコルチン類同タンパクであると考え，分離精製を行い，生理活性について検討した．更に抗EEP抗体を作成し，ヒト胎盤のリポコルチン類同タンパク（以下，ヒト胎盤32kと略す）との異同を調べた．

II 実験方法

1) 粗EEPの抽出

カプセルを除去したウシ水晶体を実験材料とし，一回の抽出に，500個（約1kg）を使用した．なお，抽出はBroekhuyseらの方法[5]を簡略化して行った[1]．

2) EEP32の精製

粗EEP標品200mgを緩衝液A（10mM Tris-HCl, pH 7.5）に溶解後，緩衝液Aに対して透析を行った．緩衝液Aで平衡化したQ-セファロース・カラム（2×10cm）に粗EEPを添加し，緩衝液A 100mlで洗浄後，0～0.7M NaClのlinear gradientで溶出した．各フラクションのタンパク濃度をBradford法[26]にて測定し，タンパクの存在するフラクションについて，10% SDS-PAGEを行った．EEP34，EEP32，クリスタリンを確認し，EEP34，EEP32を含むフラクションを回収

した．

3）電気泳動

SDS電気泳動は，Laemmli法[27]により10%のSDS-PAGEを行った．二次元電気泳動は，O'Farrell[28]の方法に従い一次元目は等電点電気泳動を行い，二次元目はSDS-PAGEを行った．

4）抗体の作成

Q-セファロース・クロマトグラフィーにより分画したEEP32，EEP34を分取用SDS-PAGEにて電気泳動後，ゲルより抽出精製し，家兎に免疫した．抗EEP32抗体，抗EEP34抗体をWestern blotにて確認後，抗血清を得た．

5）**Western blot**

Towbinら[29]の方法に従った．SDS-PAGE後，デュラポア・フィルターに転写した．第二抗体には，ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を用いた．

6）アクチン結合実験

アクチンは，Spudich and Watt法[30]でウサギ背筋acetone powderより精製した．精製したG-アクチン33μgと試料45μgを，重合緩衝液(100mM KCl，1mM $MgCl_2$，5mM 2-mercaptoethanol，0.2M ATP，5mM Tris-HCl，pH 7.5）中で重合させた．緩衝液中にはEGTAまたは$CaCl_2$を終濃度1mMとなるように加え，総量を175μlとする．25℃，1時間重合させた後，約100,000×g，30分間の遠心にかけ，上清と沈澱に分け，各々SDS-PAGEで分析した．

7）リン脂質リポゾーム結合実験

リポゾーム液50μlに試料45μgを加え，緩衝液(終濃度2mM $MgCl_2$，50mM Tris-HCl，pH 7.5）中で混合し，更にEGTAまたは$CaCl_2$を終濃度1mMとなるように加え，総量を175μlとする．25℃30分間，incubation後，100,000×g，30分間遠心し，沈澱及び上清を各々SDS-PAGEを行い，分析した．更にコレステロールをコントロールとして，フォスファチジール・コリン，フォスファチジール・セリン，フォスファチジール・エタノールアミン，フォスファチジール・イノシトールをそれぞれ単独に含むリポゾーム液を作成し，$CaCl_2$存在下での，試料とリポゾームとの結合性を調べた．

8）ホスホリパーゼA_2活性の測定

Rothhutら[31]，Davidsonら[32]の方法に準じて，下記の要領で行った．[^{3}H]Oleic acidでラベルしたE・Coli (HB101 strain）細胞膜の懸濁液を加熱処理し更に洗浄後，約3×10^6cpm/mlとなるように調整したものを基質として用いた．緩衝液（175mM Tris-HCl，17.5 mM $CaCl_2$，pH 8.0）にブタ膵臓ホスホリパーゼA_2（ベーリンガー）50ngと試料(リポコルチンIまたは精製EEP32-A）を加え総量を300μlとし，4℃，10分間のpreincubationを行った後，^{3}H-E・Coli 50μlを添加して反応を開始する．4℃5分間のincubation後，2 NHCl 100μl，BSA（100mg/ml）100μlを加え，反応を停止させる．反応停止後，10,000×g，5分遠心し上清300μl中の放射活性を液体シンチレーション・カウンターにて測定した．

III 実験結果

1）粗EEPの抽出

前記した方法で抽出した粗EEP標品を，SDS-PAGEで泳動すると，図1に示したような3本の主要バンドが得られた．粗EEPのバンドは分子量マー

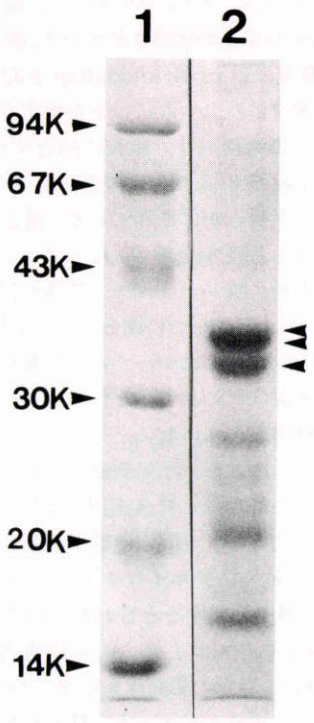


図1 粗EEPのSDS-PAGEによる解析．1は分子量マーカーを示し，上からPhosphorylase B (94kd)，Albumin (67kd)，Ovalbumin (43kd)，Carbonic anhydrase (30kd)，Tripsin inhibitor (20.1kd)，α-lactalbumin(14.4kd)である．2は今回得られた粗EEPの電気泳動パターンを示す．矢印は粗EEPのバンドである．

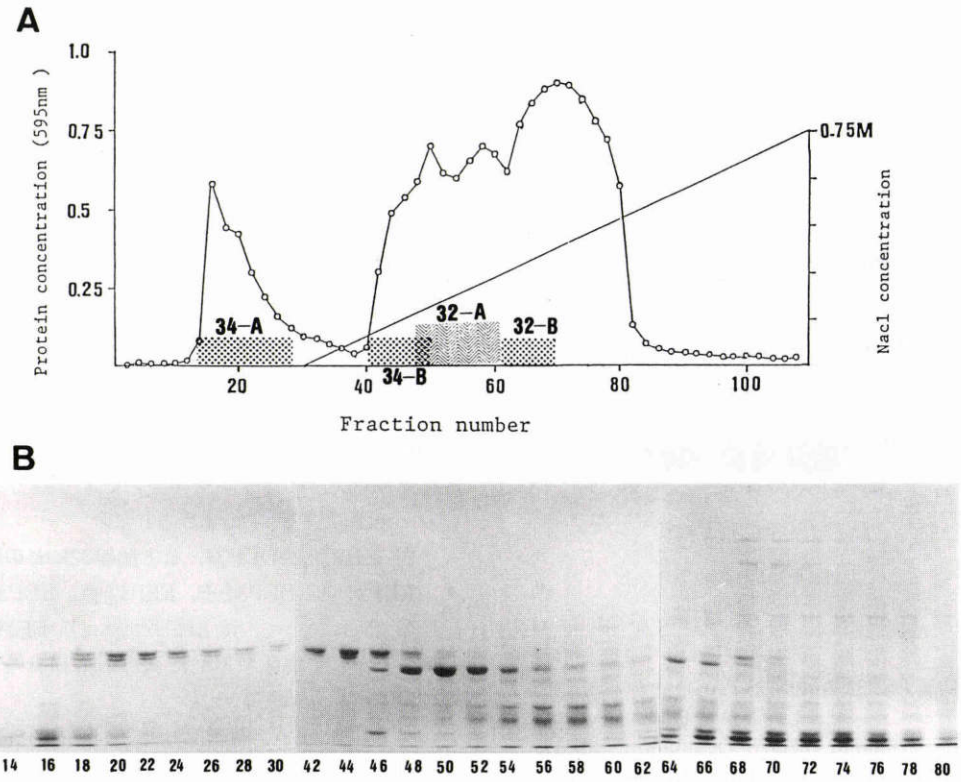


図2　EEPのQ-セファロース・クロマトグラフィーによる精製．AはQ-セファロース・クロマトグラフィーにおけるタンパクの溶出パターンを，Bは各フラクションのSDS-PAGEパターンを示す．EEP34は非吸着画分（EEP34-A）と0.1M NaClで溶出される画分（EEP34-B）に分離され，EEP32は0.1～0.25M NaClで溶出される画分（EEP32-A）と0.35～0.4M NaClで溶出される画分（EEP32-B）とに分離された．

カーの30kと43kの間にあり，相対移動度から，分子量は，35kd，34kd，32kdと推定された．

2）EEP32の精製

図2に示したように，EEP34は非吸着画分（EEP34-A）と0.1M NaClで溶出される画分（EEP34-B）とに分離された．一方EEP32は，大部分は0.1～0.25M NaClで溶出される画分（EEP32-A）に，一部は0.35～0.4M NaClで溶出される画分（EEP32-B）に分離された．EEP32-A，EEP32-Bを濃縮した標品には，EEP34-Bと低分子クリスタリンが混在していたので，次いで，タンパク量の多いEEP32-Aを精製するため，ハイドロキシアパタイト・クロマトグラフィー，更にゲル濾過を行った．図3に精製EEP32-AのSDS電気泳動パターンを示した．

3）精製EEP32-Aのゲル濾過による分子量推定

TSK gel G3000 SWカラム（0.75×60cm）に精製EEP32-A 200μgを添加し，HPLCによるゲル濾過を行った．精製EEP32-Aの分子量は30,000と推定された（図4）．なお最終標品の純度は70%であった．

4）二次元電気泳動による検討

i）Q-セファロースの溶出パターンからEEP32には少なくとも二種以上の等電点の異なるisoproteinが存在することが推測されたので，二次元電気泳動により検討した．図5に示したように，EEP32-Aには，三つの主要スポットが検出され，等電点は7.1，6.8，5.9と推定された．EEP32-Bには二つの主要スポットが検出され，等電点は5.8，5.4と推定された．二つの試料を混合したものの泳動パターンには，EEP32-Aの三つのスポットとEEP32-Bの二つのスポットからなる五つの主要スポットが検出されている．従って，EEP32には少なくとも五種の等電点バリアントが存在するものと考えられる．

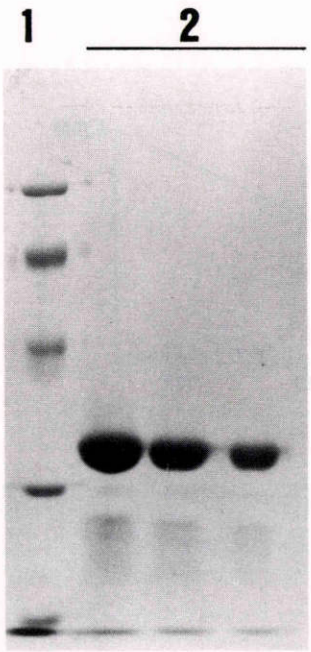


図3 精製EEP32-AのSDS-PAGEパターン．1は分子量マーカーを示し，上からPhosphorylase B (94kd)，Albumin (67kd)，Ovalbumin (43kd)，Carbonic anhydrase (30kd)，Tripsin inhibitor (20.1kd)，α-lactalbumin (14.4kd) である．2は精製EEP32-A（試料20μg，10μg，5μg）のSDS-PAGEパターンを示す．

ii）精製EEP32-AとQ-セファロースにより分画されたEEP32-Aを二次元電気泳動により比較した．図6に示したように，精製EEP32-Aには三つの主要スポットが検出され，これらはEEP32-Aの主要スポットと一致した．

5）EEP32の生物活性

i）F-アクチン結合性

図7に示したように，カルシウム存在下ではEEP32-A，EEP32-BはF-アクチンと結合し，沈澱に検出されたが，EGTAを加えカルシウムをキレートした場合には，沈澱に検出されなかった．従って，EEP32-A，EEP32-Bはともにカルシウム依存性のF-アクチン結合性を有することが示された．

ii）リン脂質リポゾーム結合性

図8に示したように，カルシウム存在下ではEEP32-A，EEP32-Bは沈澱に検出されたが，EGTA添加では沈澱に検出されず，両者はともに，カルシウム依存性のリン脂質リポゾーム結合性を有することが判った．次いで，コレステロール(C)をコントロールとして，フォスファチジール・セリン(PS)，フォスファチジール・イノシトール (PI)，フォスファチジール・エタノールアミン(PE)，フォスファチジール・コリン(PC) をそれぞれ単独に含むリポゾームとの結合性をカルシウム存在下で調べた．その結果，図9に示したように，EEP32-A，EEP32-Bはともに，PS，PI，PEとは結合し沈澱に検出されたが，C，PCとは結合しなかった．

iii）ホスホリパーゼ A_2 阻害活性

図10にリポコルチンI及び精製EEP32-Aの濃度依存性の阻害曲線を示した．50%阻害値は精製EEP32-Aは1.5μg，リポコルチンIは6μgであり，精製EEP32-Aにはリポコルチンより強力なホスホリパーゼ A_2 阻害活性が認められた．

6）EEP32とEEP34，ヒト胎盤32kとの異同

EEP34-A，EEP34-B，EEP32-A，EEP32-B，ヒト胎盤32kについて，抗EEP32抗体，抗EEP34抗体，抗ヒト胎盤32k抗体を用いたWestern blotを行い，免疫学的交差性を検討した．

i）EEP34-A，EEP34-Bは抗EEP32抗体と反応せず(図11)，EEP32-A，EEP32-Bは抗EEP34抗体と反応しなかった(図12)．従ってEEP34とEEP32は免疫学的に異なるタンパクであり，EEP32はEEP34が低分子化したものではないことが明らかである．

ii）EEP32-Aは抗EEP32抗体と反応を示した（図11）が，抗ヒト胎盤32k抗体との反応は弱かった（図13)．一方EEP32-Bは，抗EEP32抗体と反応を示さず(図11)，抗ヒト胎盤32k抗体と反応した(図13)．またヒト胎盤32kの抗EEP32抗体との反応は弱かった（図14)．以上より，抗EEP32抗体は，タンパク量の多いEEP32-Aに対する抗体が産生されたものであった．更にEEP32のうち，EEP32-Bはヒト胎盤32kと免疫学的に同一のタンパクと認識されたが，EEP32-Aはヒト胎盤32kとは交差性がなく，免疫学的に異なるタンパクであった．

IV 考 按

EEPに関する研究は，これまでBroekhuyseらのグループを中心として，粗EEP分画を用いて行われてきたが，最近EEPの34kd成分とリポコルチンとの関連が明らかにされた．今回，ウシ水晶体よりEEPのもう一つの成分である32kdタンパクを精製し，その生理活性について検討した．更に他臓器のリポコルチン類

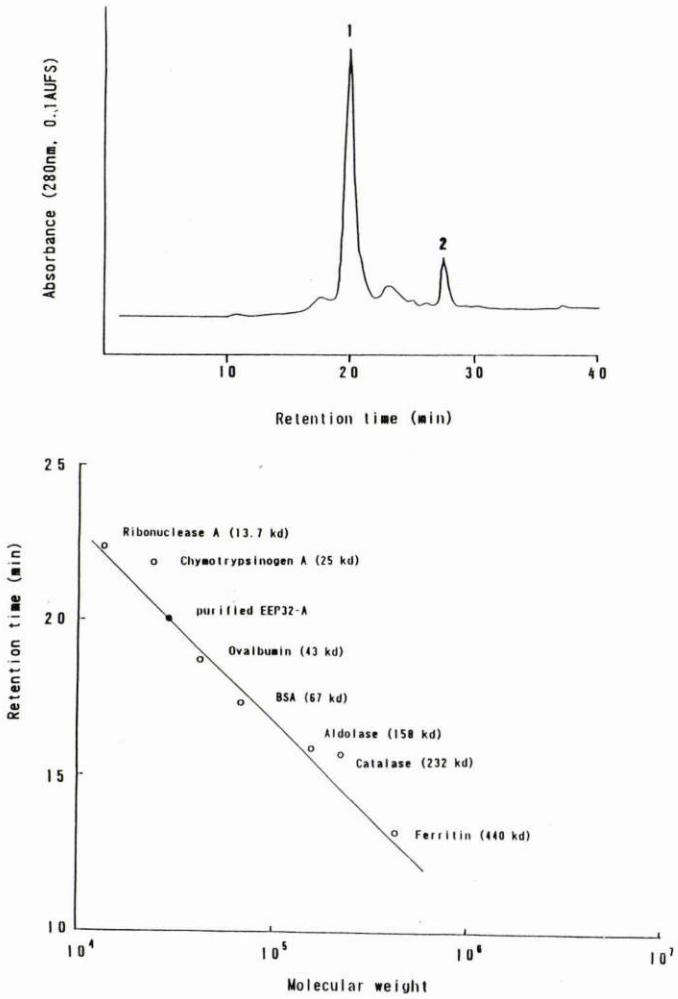


図4　ゲル濾過(SW3000G)による精製EEP32-Aの分子量推定．上図はAcA54により精製したEEP32-AのSW3000Gにおけるタンパクの溶出パターンを示す．下図の○は分子量マーカー，●は精製EEP32-A，横軸は分子量，縦軸はretention timeを示す．図8のSDS-PAGEパターンより精製EEP32-Aのピークは1であり，2は低分子クリスタリンのピークである．分子量マーカーのretention timeから得られた検量線より，精製EEP32-Aの分子量は30,000と推定された．

同タンパクとの異同を調べた．

ゲル濾過による分子量の推定から，SDS-PAGE上，32kdと推定されたEEP32の分子量は，30,000と推定された．従って，nativeな状態では，サブユニットを持たない単量体として存在するものと考えられる．また，陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンからEEP32には少なくとも二種以上の荷電の異なるisoproteinの存在が示唆されたが，二次元電気泳動による検討からEEP32には少なくとも五種の等電点バリアントが存在することが推定された．即ちEEP32-Aには，pI′ 7.1, 6.8, 5.9の三つのバリアントが，EEP32-BにはpI′ 5.8, 5.4のバリアントが検出された．これらのバリアントの存在は以下のことを推察させる．即ち，リポコルチンもEEPもいずれもリン酸化を受けることが明らかにされていることから，等電点の高いタンパクがリン酸化されバリアントを形成している可能性が考えられる．また，Western blotの結果からEEP32-AとEEP32-Bは免疫学的に異なるタ

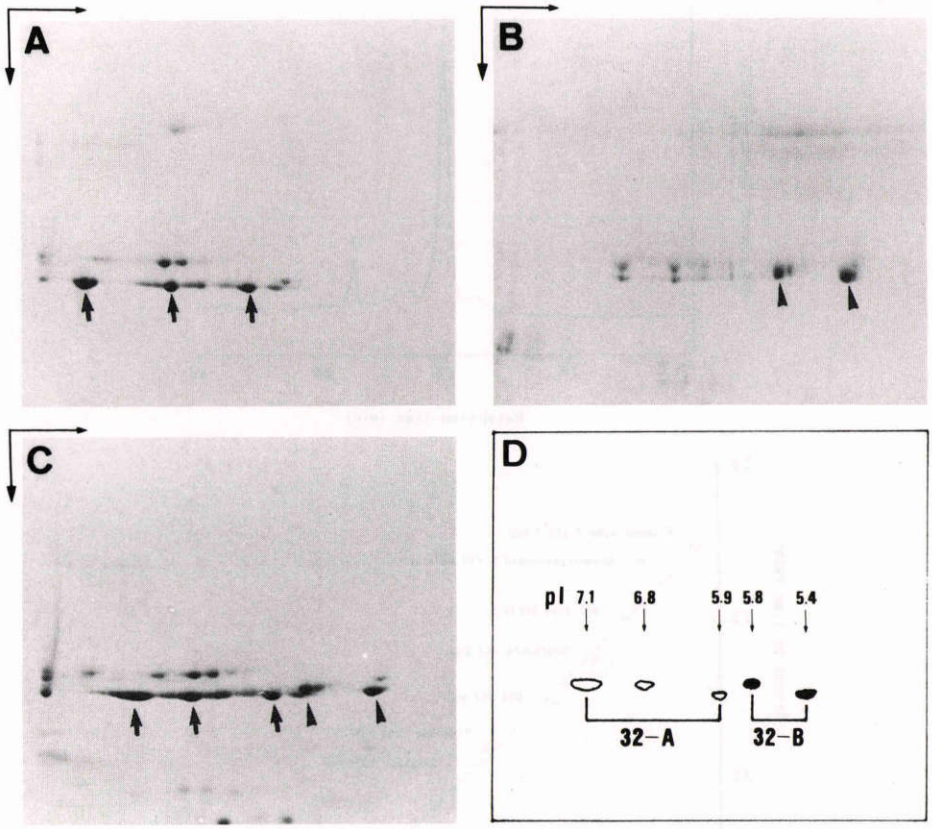


図5 二次元電気泳動によるEEP32-AとEEP32-Bの比較検討．AはEEP32-A，BはEEP32-B，CはEEP32-AとEEP32-Bの混合物の二次元電気泳動パターンを示す．↑はEEP32-Aの主要スポット，▲はEEP32-Bの主要スポットを示す．Dに検出した各スポットについてのダイアグラムを示した．○はEEP32-A，●はEEP32-Bで検出されたスポットを示す．EEP32-Aには三つの主要スポット（pI，約7.1，6.8，5.9）が，EEP32-Bには二つの主要スポット（pI，約5.8，5.4）が検出された．

ンパクであることが判明したが，EEP32-A，EEP32-Bのそれぞれに更に抗原性の異なるタンパクが存在する可能性も考えられる．今回，精製されたEEP32-AにはEEP32-Aと同じ三つのバリアントが検出されているので，今後，更に各バリアントを分離精製し単一標品としたうえで比較検討する必要があろう．

アクチン結合性，リン脂質結合性の検討から，EEP32-A，EEP32-Bはともに，リポコルチンと同様のカルシウム依存性のアクチン結合性，カルシウム依存性のリン脂質結合性を有することが判った．カルシウム存在下での各種リン脂質リポゾームとの結合実験においては，EEP32-A，EEP32-Bはともに PS，PE，PIと結合したが，PCとは結合しなかった．EEP32とリン脂質との結合の機序については，PS，PIのような酸性リン脂質と結合することからカルシウムを介するイオン結合による可能性，あるいはPEのような塩基性リン脂質とも結合することから疎水結合による可能性が推測されるが，EEP32のアクチン結合性，リン脂質結合性は，EEP32が細胞膜と細胞骨格の連結に何らかの機能を果たしていることを示唆している．更に，精製EEP32-AにはリポコルチンよりもホスホリパーゼA_2阻害活性が認められ，ロイコトリエンやプロスタグランジンの産生抑制による抗炎症作用においてEEP32がEEP34以上に大きな役割を果たしているものと考えられた．これらの生理機能の検討より，EEP32-Aはリポコルチンと共通の生理活性を有する

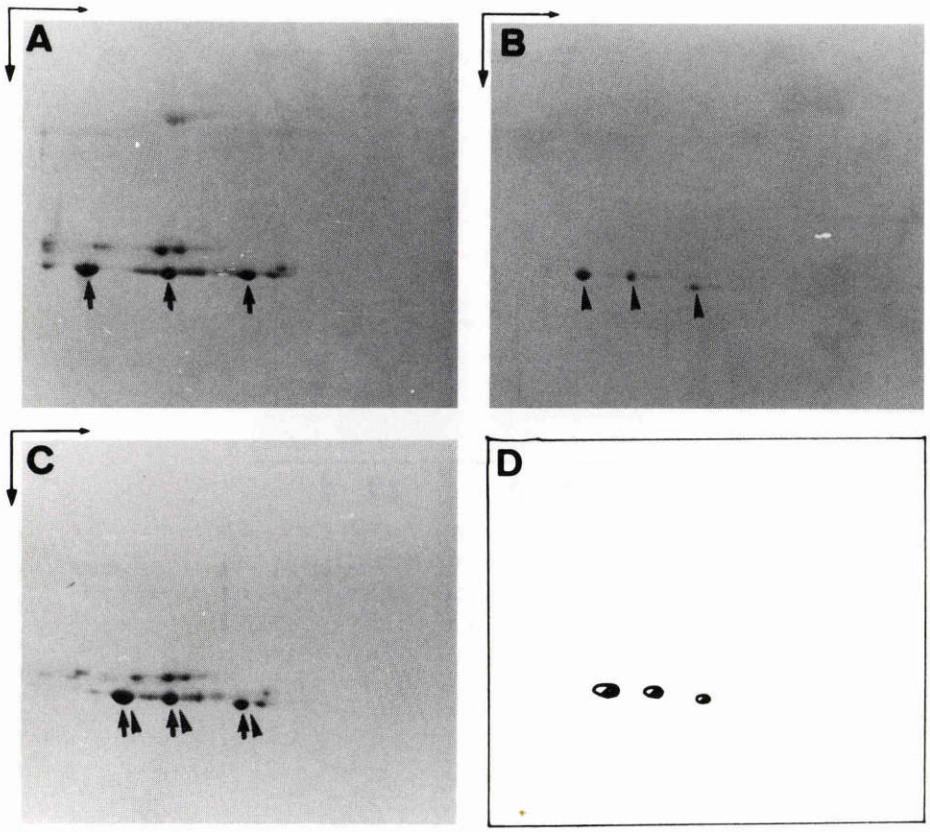
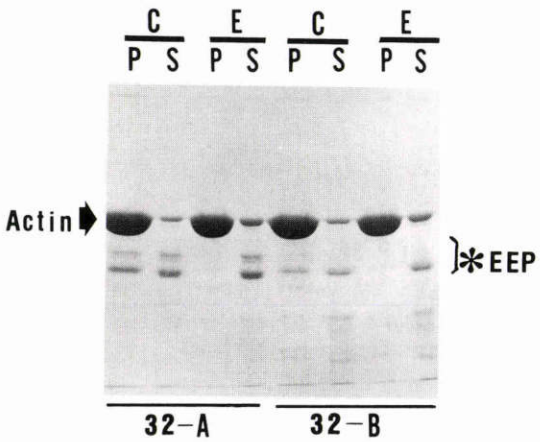


図6　二次元電気泳動によるEEP32-Aと精製EEP32-Aの比較検討．Aは EEP32-A，Bは精製EEP32-A，CはAとBを混合した試料の電気泳動パターンを示す．↑はEEP32-Aの主要スポット，▲は精製EEP32-Aの主要スポットを示す．Dに検出した各スポットについてのダイアグラムを示した．精製EEP32-Aの主要スポットはEEP32-Aの主要スポットと一致した．



ことが確認された．

EEP32はEEP34と分子量が近似しており，EEP34がタンパク分解酵素によって低分子化した可能性も考えられたが，両者間には免疫学的交差性がなく，EEP32はEEP34の加水分解産物ではなかった．更にEEP32のうちEEP32-Bはヒト胎盤32kと交差性を有し，両者は同一のタンパクと考えられたが，EEP32の主成分

図7　EEP32-A, EEP32-Bのアクチン結合性．Sは上清，Pは沈澱を表し，Cは1mM $CaCl_2$を含む緩衝液，Eは1mM EGTAを含む緩衝液であることを示している．＊で示したバンドがEEPで⇨で示したバンドはアクチンである．カルシウム存在下ではEEP32-A, EEP32-Bはアクチンと結合し，沈澱に回収され，EGTA存在下では沈澱には検出されない．

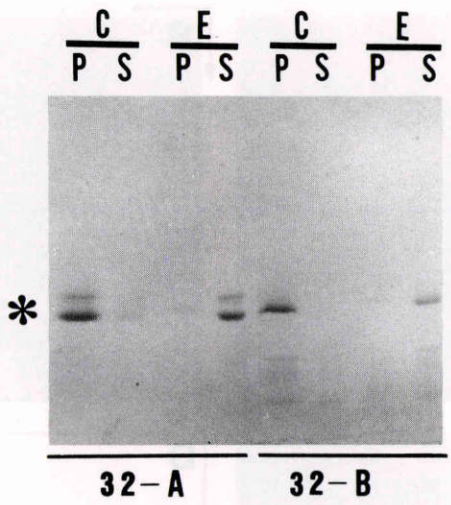


図8 EEP32-A，EEP32-Bのリン脂質リポゾーム結合性．Sは上清，Pは沈澱を表し，Cは1mM $CaCl_2$を含む緩衝液，Eは1mM EGTAを含む緩衝液であることを示している．＊で示したバンドがEEPである．EEP32-A，EEP32-Bはカルシウム存在下では沈澱に，EGTA存在下では上清に検出される．

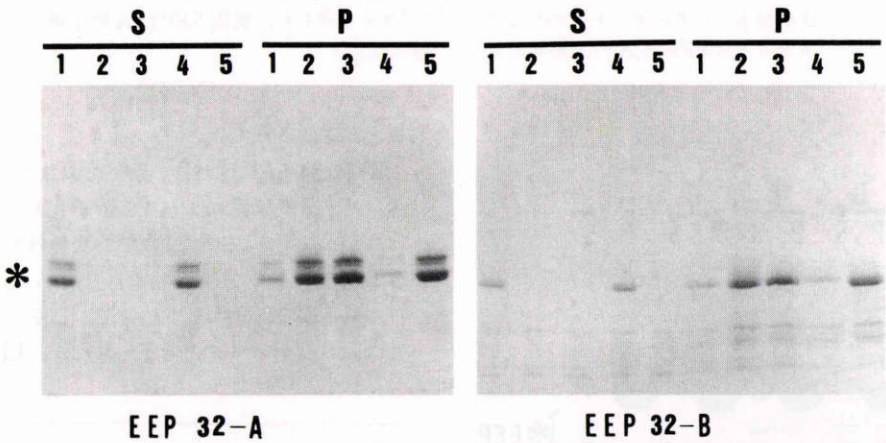


図9 EEP32-A，EEP32-Bのカルシウム存在下での各種リン脂質リポゾーム結合性．Sは上清，Pは沈澱を表し，1はコレステロール（C），2はホスファチジール・セリン（PS），3はホスファチジール・イノシトール（PI），4はホスファチジール・コリン（PC），5はホスファチジール・エタノールアミン（PE）を含むリポゾームを示し．＊で示したバンドがEEPである．EEP32-A，EEP32-BはC，PCを含むリポゾームとは結合せず上清に，PS，PI，PEを含むリポゾームとは結合して沈澱に検出される．

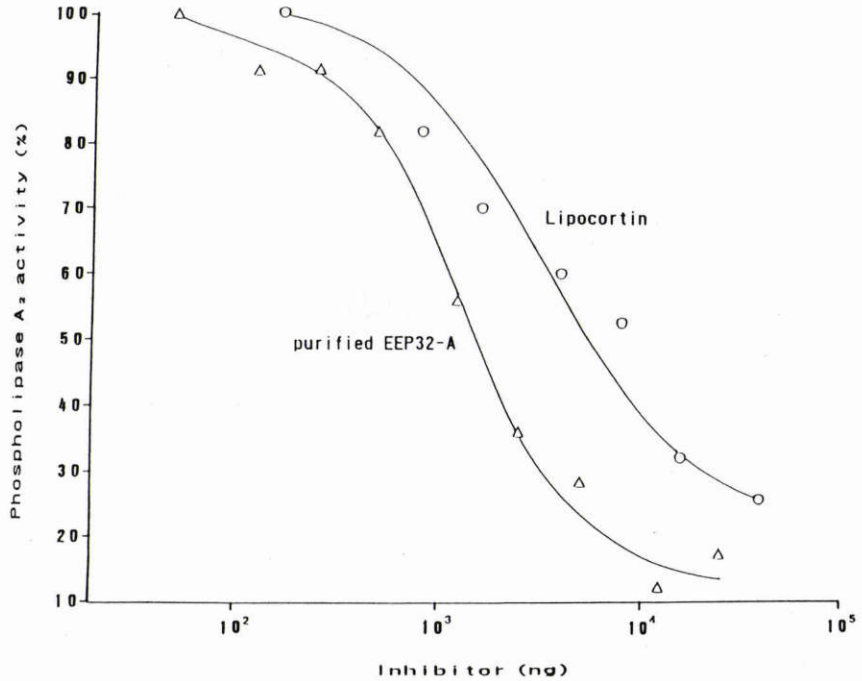
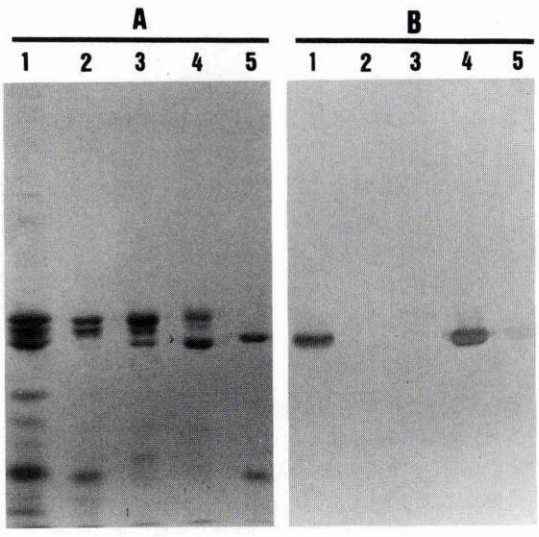


図10　精製 EEP32-A とリポコルチンⅠのホスホリパーゼ A_2 阻害活性．横軸はリポコルチンⅠ（○）および精製 EEP32-A（△）のタンパク量を示し，縦軸はホスホリパーゼ A_2 活性を示す．50%阻害値は精製 EEP32-A は1.5μg，リポコルチンⅠは6μg であり，精製 EEP32-A にはリポコルチンⅠより強いホスホリパーゼ A_2 阻害活性が認められた．

である EEP32-A はヒト胎盤32k とは免疫学的に異なるタンパクであった．即ち，EEP32には抗原性の異なる二種の isoprotein が存在することが判った．



今回の実験から得られた EEP32-A の実験結果を，他臓器の32kd のリポコルチン類同タンパクと比較すると，両者は分子量が近似し，ともに単量体である[16)18)20)]．更に EEP32-A はカルシウム依存性，アクチン結合性，リン脂質結合性，ホスホリパーゼ A_2 阻害活性といったリポコルチンと共通の生理活性を有していた．以上の実験結果より，EEP32の主成分である EEP32-A はリポコルチン類同タンパクであるとの結論を得た．更に免疫学的検討から EEP32-A はヒト胎盤32k と交差性が認められないのに対し，EEP32-B は

図11　粗 EEP，EEP34，EEP32に対する抗 EEP32抗体による Western blot. 1は粗 EEP，2は EEP34-A，3は EEP34-B，4は EEP32-A，5は EEP32-B を示す．A は SDS-PAGE の Coomassie brilliant blue によるタンパク染色，B は抗 EEP32抗体による染色を示す．粗 EEP と EEP32-A が抗 EEP32抗体によって染色されている．

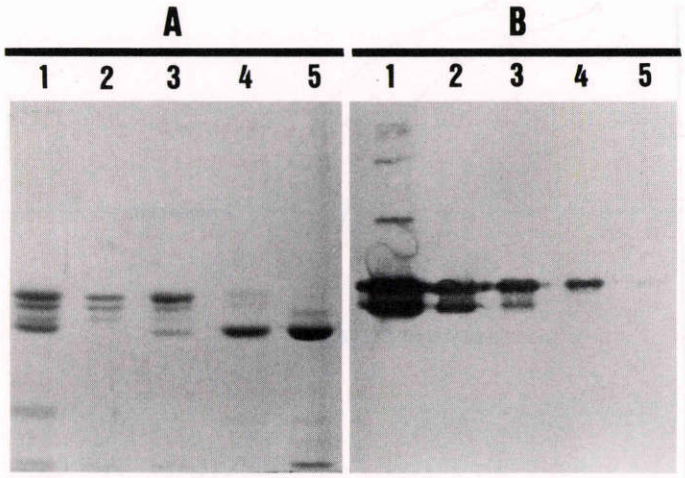


図12 粗EEP，EEP34，EEP32に対する抗EEP34抗体によるWestern blot．1は粗EEP，2はEEP34-A，3はEEP34-B，4はEEP32-A，5はEEP32-Bを示す．AはSDS-PAGEのCoomassie brilliant blueによるタンパク染色，Bは抗EEP34抗体による染色を示す．粗EEP，EEP34-A，EEP34-BとEEP32-A，EEP32-Bにわずかに混在するEEP34が抗EEP34抗体によって染色されているが，EEP32-A，EEP32-Bは染まらない．

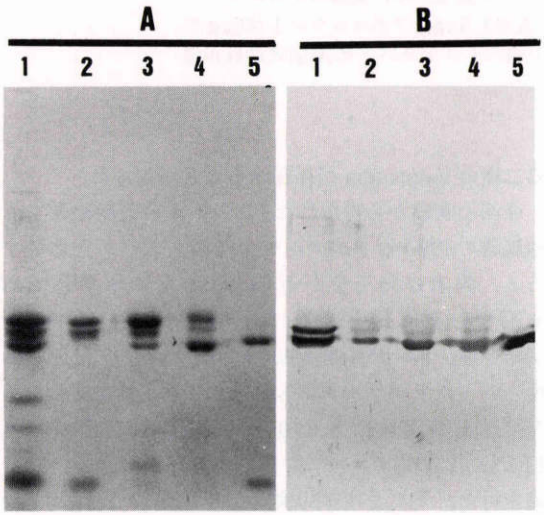


図13 粗EEP，EEP34，EEP32に対する抗ヒト胎盤32k抗体によるWestern blot．1は粗EEP，2はEEP34-A，3はEEP34-B，4はEEP32-A，5はEEP32-Bを示す．AはSDS-PAGEのCoomassie brilliant blueによるタンパク染色，Bは抗ヒト胎盤32k抗体による染色を示す．粗EEP，EEP32-Bが抗ヒト胎盤32k抗体によって強く染まっているが，EEP34-A，EEP34-B，EEP32-Aの染色は弱い．

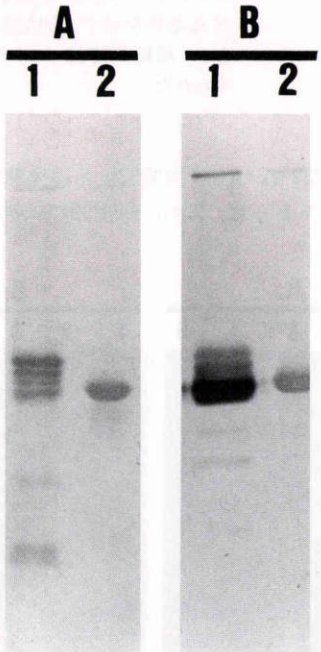


図14 粗EEPとヒト胎盤32kに対する抗EEP32抗体によるWestern blot．1は粗EEP，2はヒト胎盤32kを示し，AはSDS-PAGEのCoomassie brilliant blueによるタンパク染色，Bは抗EEP32抗体による染色を示す．粗EEPは抗EEP32抗体によって強く染まっているが，ヒト胎盤32kの染色は弱い．

交差性を有していたことから，EEP32-Bもまたリポコルチン類同タンパクと考えられた．このことは免疫学的交差性のみならず，カルシウム依存性のアクチン結合性，カルシウム依存性のリン脂質結合性といったリポコルチンと共通の生理活性がEEP32-Bにも認められたことからも窺える．以上より，ウシ水晶体EEP32には，等電点と抗原性を異にする二種のリポコルチン類同タンパクが存在することが示唆された．分子量，抽出性，カルシウム依存性の類似性よりEEP32とヒト胎盤32kが同一タンパクであろうとの当初の予想と相違する新しい知見が得られた．

32kdタンパクは，カルシメジン，カルエレクトリン，エンドネキシン，Protein IIなどの名称で報告されているが，カルエレクトリン（ウシ副腎，肝，脳）は等電点が5.6～5.8[19)20)]，Protein II（ブタ小腸上皮，ブタ肝臓）は6.5[16)18)]と報告されている．両タンパクに関しては比較検討されていないので，両者が同一のものなのかあるいは等電点の異なる二種のisoproteinなのかは不明であるが，EEP32-Aは後者と，EEP32-Bは前者と等電点が近似したバリアントを有することから，EEP32-AはProtein IIと，EEP32-Bはカルエレクトリンと同一である可能性がある．今後EEP32のアミノ酸配列を決定し検討する必要があろう．

文　献

1) 高橋久志，太田厚子，中山龍子他：EEP34-kilodalton proteinに関する研究．日眼　93：132—141, 1989.

2) **Bloemmendal H, Vermorken AJM, Kibbelar M,** et al: Nomenclature for the polypeptide chains of lens plasma membranes. Exp Eye Res 24：413—415, 1977.

3) **Broekhuyse RM, Kuhlmann ED:** Lens membranes. I. Composition of urea treated plasma membranes from calf lens. Exp Eye Res 19：297—302, 1974.

4) **Bauman AA, de Leeuw ALM, Broekhuyse RM:** Lens membranes. XII. Comparative study of biochemical characteristics of the fiber membrane polypeptides from bovine, pig, sheep and chicken lens. Exp Eye Res 32：491—500, 1981.

5) **Broekhuyse RM, Kuhlmann ED:** Lens membranes. IV. Preparative isolation and characterization of membranes and various membrane proteins from calf lens. Exp Eye Res 26：305—320, 1978.

6) **Bauman AA, Broekhuyse 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.

7) **Bauman AA, de Leeuw ALM, Broekhuyse RM:** Lens membrane. XV. Comparative study of membrane and cytoplasmic proteins from human , monkey and other animal lenses. Exp Eye Res 33：309—314, 1981.

8) **Raaij AJM, de Leeuw ALM, Broekhuyse RM:** Complex formation of EDTA-extractable proteins from calf lens fiber membranes with calcium and acidic phospholipid. Exp Eye Res 40：477—487, 1985.

9) **Raaij AJM, Feijen A, Snoek GM:** EDTA-extractable proteins from calf lens fiber membranes are phosphorylated by Ca^{2+}-phospholipid-dependent protein kinase. Exp Eye Res 45：215—225, 1987.

10) **Russel P, Zelenka P, Martensen J,** et al: Identification of the EDTA-extractable protein in lens as calpactin I. Current Eye Research 6：533—538, 1987.

11) **Huang KS, Wallner BP, Mattakiano RJ,** et al: Two human 35kd inhibitors of phospholipase A_2 are related to substrates of $pp60^{v-src}$ and of the epidermal growth factor receptor/kinase. Cell 46：191—199, 1986.

12) **Glenny J:** Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca^{2+}-dependent manner. Biochemistry 83：4258—4262, 1986.

13) **Saris CJM, Tack BF, Kristensen J,** 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.

14) **Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C,** et al: Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A_2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. Nature 320：77—81, 1986.

15) **Glenny JR:** Phosphorylation of p36 in vitro with $pp60^{src}$. Regulation by Ca^{2+} and phospholipid. FEBS 192：79—82, 1985.

16) **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 3：227—233, 1984.

17) **Gerke V, Weber K:** Calcium-dependent conformational changes in the 36-kDa subunit of intestinal protein I related to the cellular 36-kDa target of Rous sarcoma virus tyrosine kinase. J Biol Chem 260: 1688—1695, 1985.

18) **Shadle PJ, Gerke V, Weber K:** Three Ca^{2+}-binding proteins from porcine liver and intestine differ immunologically and physicochemically and are distinct in Ca^{2+} affinities. J Biol Chem 260: 16354—16360, 1985.

19) **Geisow M, Childs J, Dash B,** et al: Cellular distribution of three mammalian Ca^{2+}-binding proteins related to Torpedo calelectrin. EMBO 3: 2969—2974, 1984.

20) **Südhof TC, Ebbecke M, Wallker JH,** et al: Isolation of mammalian Calelectrins: A new-class of ubiquitous Ca^{2+}-regulated proteins. Biochemistry 23: 1103—1109, 1984.

21) **Walker JH:** Isolation from cholinergic synapses of a protein that binds to membranes in a calcium-dependent manner. J Neurochem 39: 815—823, 1982.

22) **Südhof TC, Walker JH, Obrocki J:** Calelectrin self-aggregates and promotes membrane aggregation in the presence of calcium. EMBO 1: 1167—1170, 1982.

23) **Davies AA, Crumpton MJ:** Identification of calcium-binding proteins associated with the lymphocyte plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 128: 571—577, 1985.

24) **Moore PB, Dedman JR:** Calcium-dependent protein binding to phenothiazine columns. J Biol Chem 257: 9663—9667, 1982.

25) **Kretsinger RH, Creuts CE:** Concensus in exocytosis. Nature 320: 537, 1986.

26) **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248—254, 1976.

27) **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature 227: 680—685, 1970.

28) **O'Farrell PH:** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007—4021, 1975.

29) **Towbin H, Staehlin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350—4354, 1979.

30) **Spudich JA, Watt S:** The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J Biol Chem 246: 4866—4871, 1971.

31) **Rothhut B, Russo-Marie F, Wood J,** et al: Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein "Renocortin". Biochem Biophys Res Commun 117: 878—884, 1983.

32) **Davidson FF, Dennist EA, Powell M,** et al: Inhibition of phospholipase A_2 by "Lipocortins" and Calpactins, An effect of binding to substrate phospholipids. J Biol Chem 262: 1698—1705, 1987.