

# 34kDa EDTA-Extractable Protein (EEP34k) の精製, 生理活性及び免疫学的検討

—第2報— (図10, 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\*・桜木 章三 (\*秋田大学医学部第2生化学教室)

## 要 約

水晶体膜タンパクの一つ, EDTA-extractable protein の34kDa 成分 (EEP34k) が, phospholipase A<sub>2</sub> 阻害タンパクであるリポコルチンと免疫学的に同一であることは既に明らかにされている。前回, 我々は EEP34k を陰イオン交換クロマトグラフィーによって34k(A)と34k(B)に分け, 共に抗リポコルチン I 及び II 抗体と免疫学的交叉性を示すことやその生理活性を報告した。今回, 34k(A), 34k(B) を更に陽イオン交換クロマトグラフィーによって34k(A)<sub>1</sub>, 34k(A)<sub>2</sub>, 34k(B)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub> の4種に分けて検討した。その結果, 34k(A)<sub>1</sub> と34k(B)<sub>2</sub> とは, その分子量, ペプチドマップ, 免疫学的交叉性から, 極めて近縁のタンパクであり, リポコルチン I と同一, もしくは酷似したタンパクであるとの結論を得た。また, 34k(A)<sub>2</sub> は, リポコルチン II である可能性が示唆された。故に, EEP34k には I と II の少なくとも2種以上のリポコルチンが含まれ, 更に, phospholipase A<sub>2</sub> 阻害活性の存在により, 生理活性の面からも, EEP34k がリポコルチン関連タンパクであることを実証した。(日眼会誌 93: 636-645, 1989)

キーワード: EDTA-extractable protein (EEP), リポコルチン, phospholipase A<sub>2</sub> 阻害活性, 水晶体膜タンパク

## Biochemical and Immunological Properties of 34kDa EDTA-Extractable Protein (EEP34k)

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

*Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine*

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

## Abstract

It has been reported that the 34kDa protein of EDTA-extractable protein (EEP34k) cross-reacted with lipocortin antisera. The lipocortins are a family of proteins that have been reported to inhibit phospholipase A<sub>2</sub>. Previously, we purified two proteins from EEP34k by anion-exchange chromatography, and referred to them as 34k (A) and 34k (B). On Western-blot analysis, two proteins showed cross-reactivity to both lipocortin I and lipocortin II. In this study, four proteins (34k(A)<sub>1</sub>, 34k(A)<sub>2</sub>, 34k(B)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>) were isolated from 34k (A) and 34k (B), on a cation-exchanged chromatography. By peptide mapping, immunological analysis and SDS/PAGE, we confirmed that 34k (A)<sub>1</sub> and 34k (B)<sub>2</sub>

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  
(平成元年3月9日受付, 平成元年5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 March 9, 1989 and accepted in revised form May 8, 1989)

were identified proteins and these were called lipocortin I, and that 34k (A)<sub>2</sub> was lipocortin II. It is concluded that at least two lipocortins, I and II are present in EEP34k. We also observed the presence of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory activity in both 34k (A) and 34k(B). (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 636-645, 1989)

key word : EDTA-extractable protein (EEP), Lipocortin, Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory activity, Lens membrane protein

## I 緒 言

EEP に関してはこれまでに、Broekhuysen らのグループを中心に多数の報告がなされている<sup>1)~3)</sup>。最近、EEP と、phospholipase A<sub>2</sub> 阻害タンパクである lipocortin の抽出法が類似していることから、EEP34 kDa 成分が lipocortin I あるいは II と免疫学的交叉性をもつことが示された<sup>4)5)</sup>。Lipocortin は phospholipase A<sub>2</sub> を阻害することにより、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としての機能が推測され、大きな関心を集めている。この lipocortin I あるいは II と、EEP のなかの少なくとも一成分が免疫学的交叉性を有するという報告は、これまでの水晶体の生化学的研究の中で、画期的なものであった。Lipocortin I, II は Huang らがヒト胎盤より分離、精製した 2 種の phospholipase A<sub>2</sub> 阻害タンパクであり、互いにアミノ酸配列上約 50% の相同性を有するものである<sup>6)</sup>。しかし、EEP が lipocortin I であるのか、II であるのか、またはその両者が含まれるのか、更には他の lipocortin 関連タンパクであるのかなどに関する詳細な検討はこれまでなされていない。前回、著者らは、EEP34k を陰イオン交換クロマトグラフィーによって 34k(A) と 34k(B) の 2 種に分け、共に Ca<sup>++</sup> に依存したアクチン結合性、リン脂質結合性を有し、共に抗 lipocortin I 及び II 抗体と反応して、免疫学的交叉性を示すことを報告した<sup>7)</sup>。今回の研究では、34k(A)、34k(B) を、更に陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、4 種のタンパクに分類した。各々のタンパクは、分子量や等電点に僅かの相違がみられ、その異同を明らかにするために、ペプチドマッピング、及び抗ヒト胎盤 lipocortin I, II 抗体による免疫学的検討を行った。また、34k(A)、34k(B) の phospholipase A<sub>2</sub> 阻害活性を測定し、生理活性の面からも、EEP34k が lipocortin 関連タンパクであることを確認した。

## II 実験方法

### 1) EEP34k の抽出と精製

実験材料はカプセルを除いたウシの水晶体を用いた。1 回の抽出に 500 個 (約 1kg) を使用し、抽出は図 1 に示すように、Broekhuysen らの方法<sup>1)</sup> を簡略化して行った。粗 EEP 標品 200mg を buffer D (10mM Tris-HCl pH 7.5) に溶解後、buffer D にて平衡化した Q-Sepharose カラムに添加した。約 200ml の buffer D にて洗浄後、0 ~ 0.75M NaCl を含む buffer D 400ml

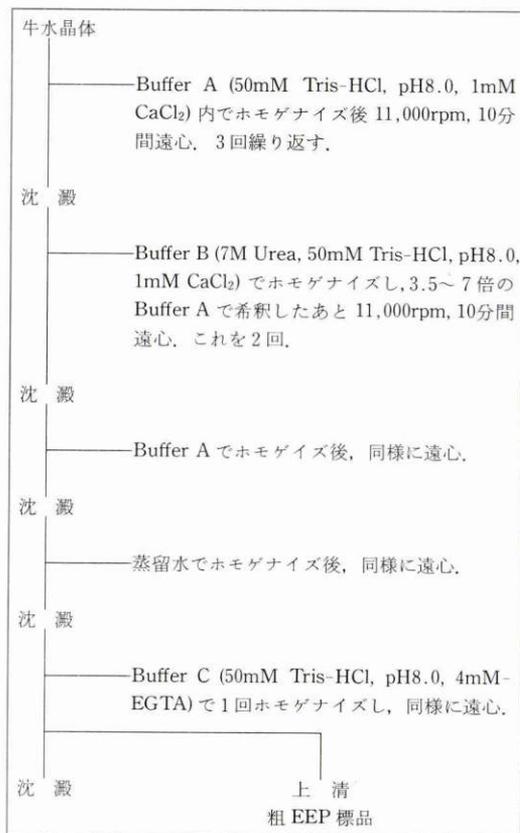


図 1 EEP 抽出法の概要

の linear gradient でタンパクを溶出し34k(A), 34k(B)に分画した. 更に34k(A), 34k(B)を各々, buffer E (10mM CH<sub>3</sub>COONa pH6.5) に溶解後, buffer E にて平衡化した S-Sepharose カラムに添加した. 約 200ml の buffer E にて洗浄後, 0~0.75M NaCl を含む buffer E 400ml の linear gradient でタンパクを溶出した.

## 2) 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下 SDS/PAGE と略す)は, Laemmli の方法<sup>8)</sup>によった. 二次元電気泳動は, O'Farrel の方法<sup>9)</sup>に従って行った. 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.

## 3) ペプチドマッピング

一次元ペプチドマッピングは Cleveland らの方法に準じた<sup>10)</sup>. Q-Sepharose, 次いで S-Sepharose で精製した標品200 $\mu$ l (0.5mg/ml) と, Staphylococcus aureus V8 protease を各々2 $\mu$ g, 1 $\mu$ g 混合し, 37 $^{\circ}$ C 30分間の incubation を行った. Incubation 後, 100 $^{\circ}$ C 2分間加熱して反応を停止させ, SDS/PAGE (15%) を行った. 泳動後 Morrissey の方法<sup>11)</sup>に従って銀染色を行いバンドを検出した.

## 4) Phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性測定

Rothhut<sup>12)</sup>, Davidson<sup>13)</sup>らの方法に準じて行った. [<sup>3</sup>H] oleic acid でラベルした E.Coli suspension をオートクレーブで加熱処理後洗浄して約3 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm/ml となる様調製し, これを基質として用いた. ブタ膵臓 Phospholipase A<sub>2</sub>50 $\mu$ l (1mg/ml), assay buffer (175 mM Tris-HCl, 17.5mM CaCl<sub>2</sub> pH8.0) 200 $\mu$ l 及び10 mM Tris-HCl pH7.5に溶解した試料50 $\mu$ l を混合し, 4 $^{\circ}$ C 10分間の preincubation を行った. 50 $\mu$ l の<sup>3</sup>H-E. Coli を加え, 総量350 $\mu$ l として4 $^{\circ}$ C 5分間の incubation を行い, 2N HCl 100ml, ウシ血清アルブミン100 $\mu$ l (100 mg/ml) を加えて反応を停止させた. 14,000rpm 5分間の遠心の後, 上清300 $\mu$ l を液体シンチレーションカウンターにて測定した.

## 5) Western-blot

Towbin<sup>14)</sup>らの方法に従い, 試料を SDS 電気泳動後, デュラポアフィルターに転写した. 第二抗体としてペルオキシンダーゼラベル抗ウサギ IgG 抗体を使用し, 3, 3'-ジアミノベンチジン, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>にて発色させた.

# III 結 果

## 1) EEP の抽出と chromatography による精製

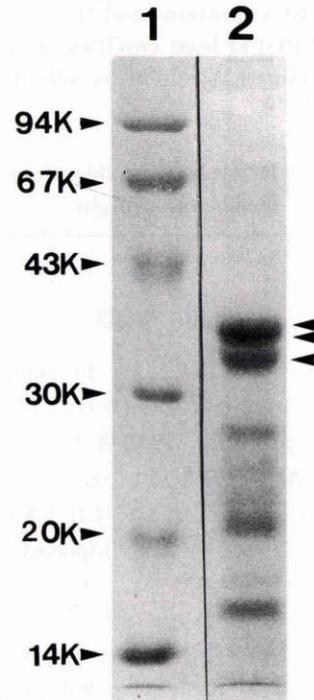


図2 粗 EEP 標品の SDS/PAGE (10%) による分析  
Lane 1 は分子量マーカーの泳動パターンを示し, 左側に概略の分子量を示す (Phosphorylase B, 94K; Bovine serum albumin, 67K; Ovalbumin, 43K; Carbonic anhydrase, 30K; Soybean trypsin inhibitor, 20K;  $\alpha$ -Lactalbumin, 14K). Lane 2 は粗 EEP の泳動パターンを示す. 右側の矢印は EEP を示すが, 分子量28,000~16,000にクリスタリンと思われる数本のバンドが混在する.

ウシ水晶体より抽出した粗 EEP の SDS/PAGE パターンを図2に示す.

粗 EEP を Q-Sepharose chromatography によって分画すると図3A に示すように, 一部はカラムに吸着されず, 残りの大部分は吸着され0.1M から0.5M の NaCl で溶出された. 非吸着画分 (フラクション 18~30) をプールし EEP34k(A) として回収した. また, 約0.2M NaCl で溶出される画分 (フラクション 42~46) を EEP34k(B) とした. 各々を更に S-Sepharose にて精製した.

図4 A に示すように, EEP34k(A) は S-Sepharose chromatography によって2つの成分に分画された. 第一のピークは約0.3M NaCl で溶出される画分で, SDS/PAGE では分子量34kDa 前後にはほぼ単一のバンドとして得られた. これを EEP34k(A)<sub>1</sub> とした. 第二

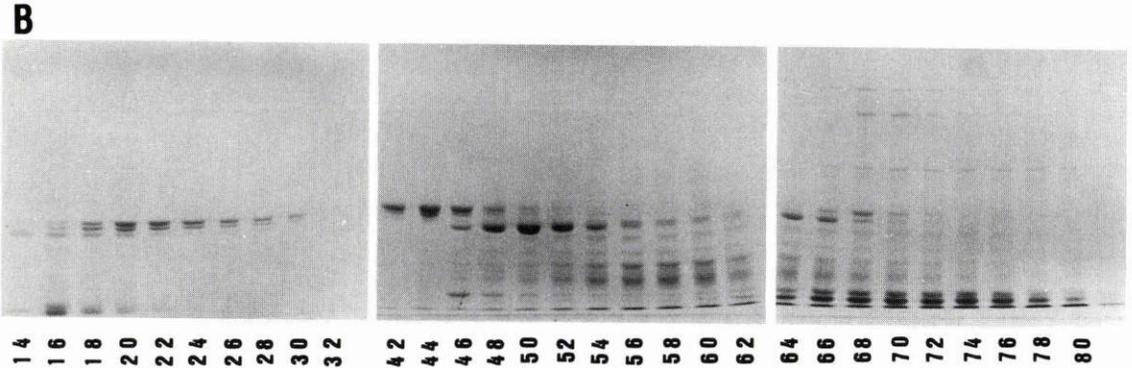
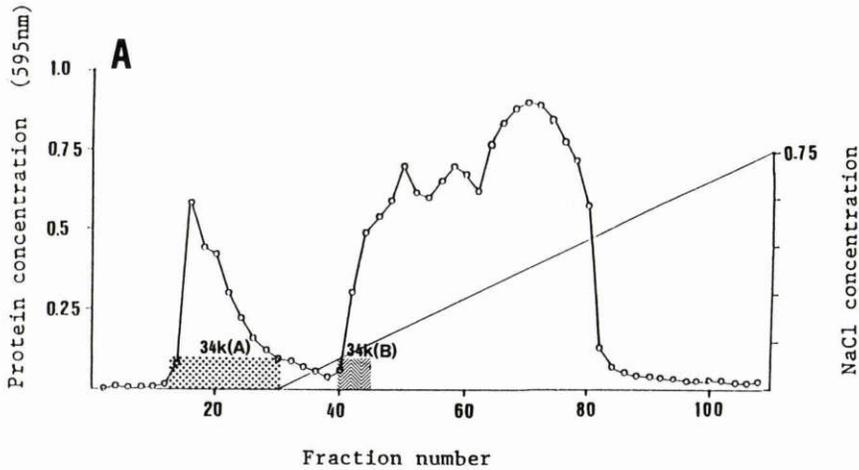


図3 粗EEPのQ-Sepharose chromatographyによる精製

図Aは、図2で示した粗EEP標品のQ-Sepharose chromatographyによる溶出パターンを示す、図Bに各フラクションのSDS電気泳動パターンを示す、下の数字はフラクションナンバーを示す、EEP34kは非吸着画分(EEP34k(A))と、約0.2M NaClによって溶出される画分(EEP34k(B))とに分けられる。

のピークは、約0.4M NaClで溶出される画分であり、SDS/PAGEでは、第一のピークでみられた34kDaタンパクよりも、やや低分子の2本のバンドが主に検出された。これをEEP34k(A)<sub>2</sub>として回収した。

EEP34k(B)もS-Sepharose chromatographyにより2つのピークに分離された(図5)が、その1つは非吸着画分に、第二の成分は約0.4~0.6M NaClで溶出される画分にみられた。非吸着画分のSDS/PAGEでは、分子量約34kDaと32kDaの2本のバンドがみられ、これをEEP34k(B)<sub>1</sub>とした。また吸着画分では、約0.4M NaCl前後の画分に、分子量34kDa付近のほぼ単一のバンドがみられた。これをEEP34k(B)<sub>2</sub>とした。

2) 二次元電気泳動

Q-Sepharose, 次いでS-Sepharoseによって分画、精製した34k(A)<sub>1</sub>, 34k(A)<sub>2</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>の二次元電気泳動の結果を図6に示した。Aは34k(A)<sub>1</sub>をBは34k(A)<sub>2</sub>をCは34k(B)<sub>2</sub>, Dは3種の混合物の泳動パターンを示す。34k(A)<sub>1</sub>は図中に白矢印で示したように、等電点約7.5の単一のスポット、34k(A)<sub>2</sub>では、これよりやや塩基性で分子量も小さい数個のスポットが見られた。また、34k(B)<sub>2</sub>は、等電点6.5~6.9前後の数個のスポットとして泳動された。

図中の矢じりは34k(B)<sub>2</sub>の主要な2個のスポットを示した。図Dでは各々のスポットの相互の関係を示している。

3) ペプチドマッピング(図7)

34k(A)<sub>1</sub>, 34k(A)<sub>2</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>の3種のタンパクに一

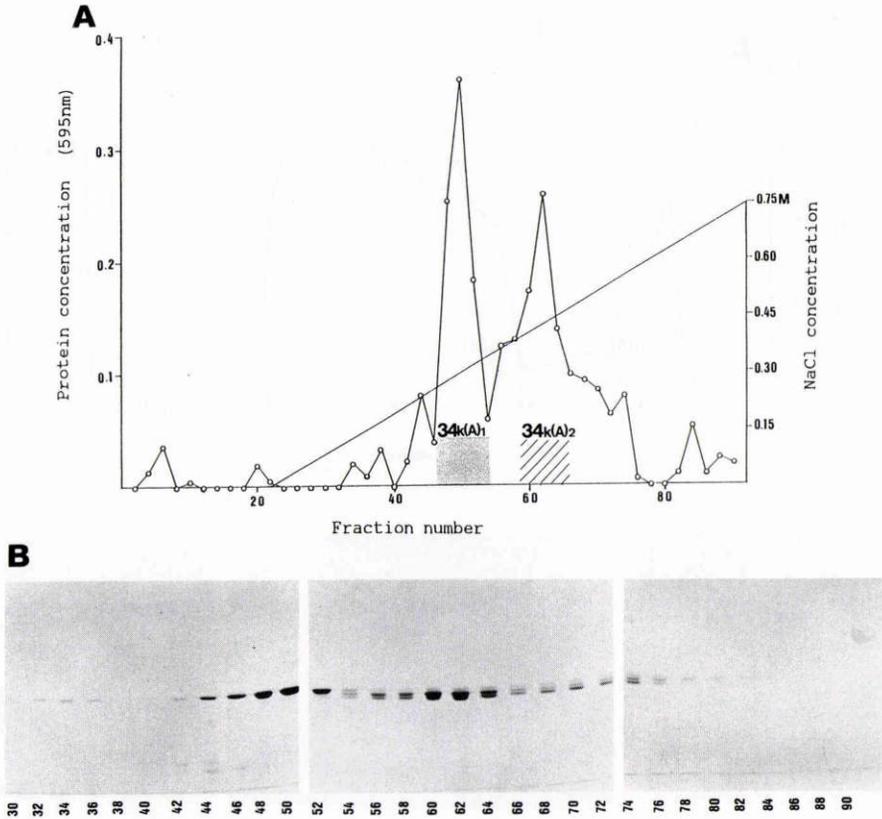


図4 EEP34(A)のS-Sepharose chromatographyによる精製

図AにEEP34k(A)のS-Sepharose chromatographyによる溶出パターンを示す。図Bに各フラクションのSDS電気泳動パターンを示す。下の数字はフラクションナンバーを示す。EEP34k(A)は、約0.3M NaClで溶出される画分(EEP34k(A)<sub>1</sub>)と約0.4M NaClで溶出される画分(EEP34k(A)<sub>2</sub>)の2つのピークに分けられる。

次配列上の類似性があるか否かを検討するために行った一次元ペプチドマッピングでは34k(A)<sub>1</sub>と34k(B)<sub>2</sub>は、よく似た加水分解パターンを示した。しかし、34k(A)<sub>2</sub>では、34k(A)<sub>1</sub>や34k(B)<sub>2</sub>とは異なったパターンを示した。この一次元ペプチドマッピングの結果から最終的結論を引き出すことはできないが、34k(A)<sub>1</sub>と34k(B)<sub>2</sub>とは一次配列が類似し、34k(A)<sub>2</sub>は34k(A)<sub>1</sub>や34k(B)<sub>2</sub>とは一次構造が異なっていると考えられた。

#### 4) Phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性

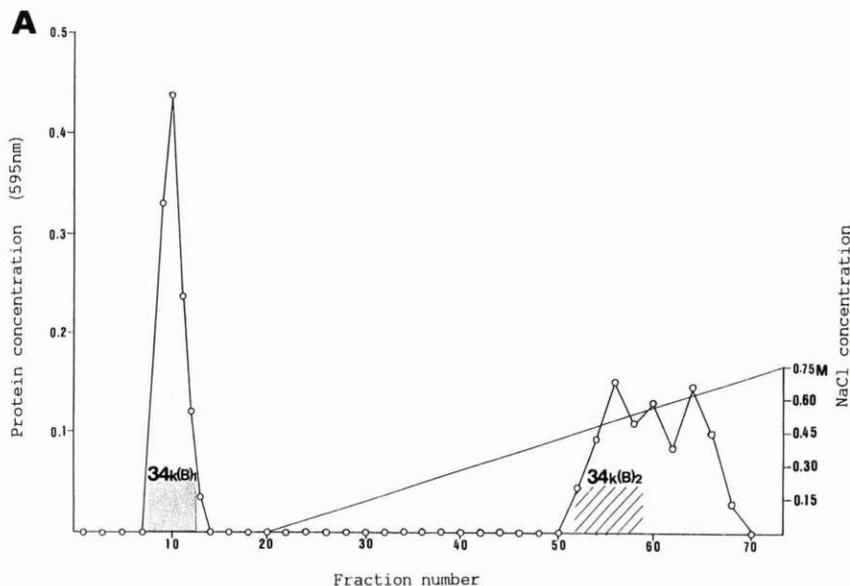
図8に、34k(A)、34k(B)の、phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性を示した。34k(A)、34k(B)はほぼ同等のphospholipase A<sub>2</sub>阻害活性を有しており、その阻害活性はEEPの濃度に依存していた。EEP34kのPhospholipase A<sub>2</sub>の50%阻害値は約4.5~6.0×10<sup>3</sup>ngであった。

#### 5) 抗 lipocortin 抗体による免疫学的交叉性の検討

Q-Sepharose, S-Sepharoseによって精製されたEEP34kの抗 lipocortin I及びII抗体によるWestern-blotを図9, 図10に示した。抗 lipocortin I抗体は34k(A)<sub>1</sub>, 34k(A)<sub>2</sub>, 34k(B)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>のすべてを染色し、免疫学的交叉性を示した。これに対し、抗 lipocortin II抗体は34k(A)<sub>2</sub>にのみ明らかな反応を示したものの、34k(B)<sub>2</sub>にたいしてバックグラウンドレベルの染色を示したに過ぎず、34k(A)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>1</sub>には全く免疫学的交叉性を示さなかった。

## IV 考 按

前回、著者らは、EEP34kをQ-Sepharose chromatographyにより、34k(A)、34k(B)の二つに分け、各々の生理活性、lipocortinとの免疫学的交叉性等に関し



B

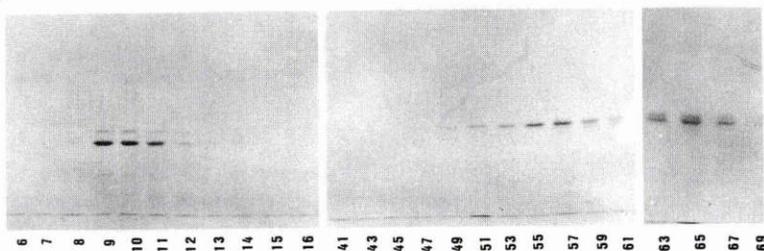


図5 EEP34k(B)のS-Sepharose chromatographyによる精製

図AにEEP34k(B)のS-Sepharose chromatographyによる溶出パターンを示す。図Bに各フラクションのSDS電気泳動パターンを示す。下の数字はフラクションナンバーを示す。EEP34k(B)は、32k成分の混在する非吸着画分(EEP34k(B)<sub>1</sub>)と約0.4 M NaClで溶出される画分(EEP34k(B)<sub>2</sub>)とに分けられる。

検討を加えた<sup>7)</sup>。その結果リン脂質結合性、アクチン結合性などの生理活性に関して34k(A)、34k(B)共に同様の態度を示し、更に両者共に抗 lipocortin I 及び II 抗体に対して反応を示した。このため、34k(A)、34k(B)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た。

これらを明らかにするため、本研究では、EEP34k を、陰イオン交換クロマトグラフィー、次いで陽イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。更に分画した各成分について、その異同を二次元電気泳動、ペプチドマッピング、Western-blot 法などにより検討し

た。その結果、EEP34k は Q-Sepharose chromatography、次いで S-Sepharose chromatography によって 34k(A)<sub>1</sub>、34k(A)<sub>2</sub>、34k(B)<sub>1</sub>、34k(B)<sub>2</sub> の少なくとも総計 4 種のタンパクに分画することができた。この 4 種のうちいくつかについては、その分子量、等電点、ペプチドマップ、phospholipase A<sub>2</sub> 阻害活性などについて検討しえた。さらに 4 種のタンパクについては抗 lipocortin I 抗体、II 抗体を用いて免疫学的比較検討を行い、これら EEP34k の 4 成分についての検討結果を表 I に示した。

まず、ほぼ単一なバンドとして得られた 34k(A)<sub>1</sub> と 34k(B)<sub>2</sub> について比較検討してみると、34k(A)<sub>1</sub> と 34

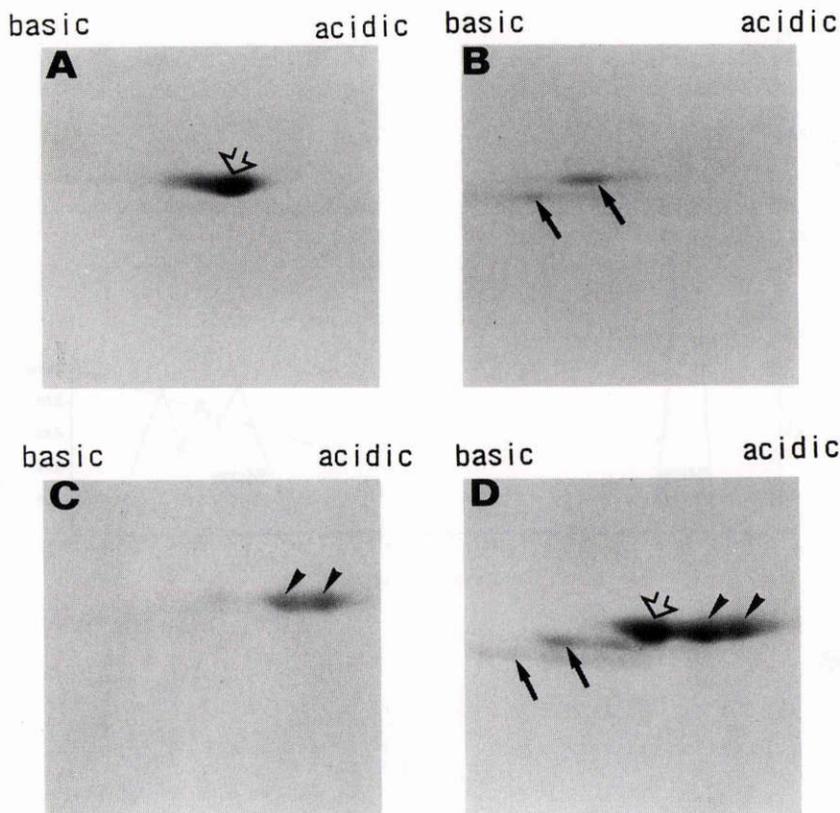


図6 EEP34k(A)<sub>1</sub>, EEP34k(A)<sub>2</sub>及びEEP34k(B)<sub>2</sub>の二次元電気泳動  
Q-Sepharose, S-Sepharose によって精製した EEP34k(A)<sub>1</sub>, EEP34k(A)<sub>2</sub>, EEP34k(B)<sub>2</sub>を O'Farrel の方法により, 一次元目は等電点泳動, 二次元目は SDS/PAGE を行った. A は EEP34k(A)<sub>1</sub>, B は EEP34k(A)<sub>2</sub>, C は EEP34k(B)<sub>2</sub>, D は EEP34k(A)<sub>1</sub>, EEP34k(A)<sub>2</sub>, EEP34k(B)<sub>2</sub>を混合したもののそれぞれの泳動パターンである.

k(B)<sub>2</sub>とは極めて近縁のタンパクであり, 従来他臓器から精製されている lipocortin I と同一, もしくは酷似したタンパクであると考えられた. 構造上の類似性を検討する目的で行った 34k(A)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>の一次元ペプチドマップは互いに一致し, 更に, 免疫学的比較検討もこの結果を支持した. すなわち, Western-blot によると, 34k(A)<sub>1</sub>は抗 lipocortin I 抗体とのみ反応し, 抗 lipocortin II 抗体とは反応しない. 34k(B)<sub>2</sub>もやはり抗 lipocortin I 抗体とは明らかに反応したが, 抗 lipocortin II 抗体ではバックグラウンドレベルの染色が見られるのみであった. しかし, 二次元電気泳動では 34k(A)<sub>1</sub>は等電点 7.5 付近に単一のスポットとして得られたのに対し, 34k(B)<sub>2</sub>は, 34k(A)<sub>1</sub>とほぼ同等の分子量ではあるものの, やや酸性で等電点 6.5~6.9 前後に主要な 2 個のスポットとして得られた. 34k

(A)<sub>1</sub>と 34k(B)<sub>2</sub>との等電点の相違は, 現在のところ何に起因するか不明である. lipocortin 及びその関連タンパクが Tyrosine kinase や C-kinase によってリン酸化を受ける<sup>15)</sup>ことから, 34k(A)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>は各々, 脱リン酸化型, 又は, リン酸化型に対応する可能性も存在する. しかし, 34k(B)<sub>2</sub>が 2 つの等電点バリエーションを含んでいること, Western-blot において抗 lipocortin II 抗体に対してもわずかに反応を示すことなどから, 34k(B)<sub>2</sub>が 2 種以上のタンパクを含んでいる可能性, あるいは 34k(A)<sub>1</sub>とは異なるタンパクである可能性も否定はできない.

34k(A)<sub>2</sub>は SDS 電気泳動上, 34k(A)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>より分子量がやや小さな 2 本のバンドであり, 二次元電気泳動上も 34k(A)<sub>1</sub>より塩基性で等電点, 分子量共に僅かに異なる 2 個以上のスポットとして検出された. 以

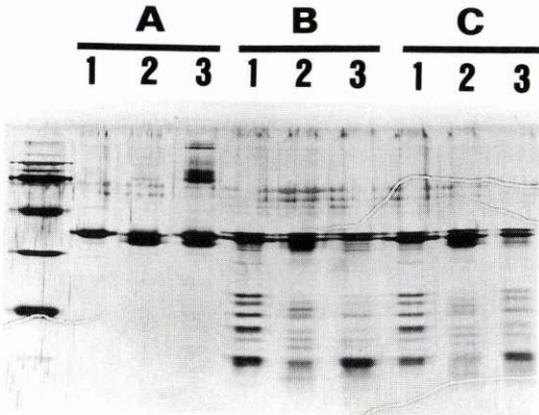


図7 EEP34k(A)<sub>1</sub>, EEP34k(A)<sub>2</sub>及びEEP34k(B)<sub>2</sub>のペプチドマッピング  
 左側に分子量マーカー, lane 1にEEP34k(A)<sub>1</sub>, lane 2にEEP34k(A)<sub>2</sub>, lane 3にEEP34k(B)<sub>2</sub>のSDS/PAGE (15%)の泳動パターンを示す. Aは, タンパク分解酵素による反応を行わないもの, Bは Staphylococcus aureus V8 protease 2µg, Cは Staphylococcus aureus V8 protease 1µgを加え, 反応させたものを示す.

上より, 34k(A)<sub>2</sub>は2種のタンパクの混在物, あるいは加水分解産物とも考えられる. しかし, 一次元ペプチドマップは34k(A)<sub>1</sub>, 34k(B)<sub>2</sub>とは明らかに異なった加水分解パターンを示し, 34k(A)<sub>2</sub>は34k(A)<sub>1</sub>, 34k

(B)<sub>2</sub>とは異なるタンパクと思われた. Western-blotの結果によれば, 34k(A)<sub>2</sub>は抗 lipocortin I 抗体及び抗 lipocortin II 抗体に対し共に反応した. これは, 抗 lipocortin I 抗体が lipocortin II に対しても免疫学的交叉性を有している結果とも考えられる. 最近 Pepinsky らは, lipocortin I 及び II の他に4種の lipocortin が存在することを発表しており, そのなかで, 抗 lipocortin I 抗体が lipocortin III に対しても免疫学的交叉性を持っていることを示した<sup>20</sup>.

これらの事実は抗 lipocortin I 抗体が, アミノ酸配列上50%相同である lipocortin II に対しても免疫学的交叉性を有する可能性を示唆するものである. また, Pepinsky らにより, ヒト胎盤より抽出された lipocortin の Mono S カラムにおける溶出パターンは34k(A)の S-Sepharose カラムによるパターン(図4)と酷似しており, NaCl を含む linear gradient によって, 最初のピークは lipocortin I が, 次のピークに lipocortin II が溶出されている<sup>6</sup>. 更には溶出された lipocortin II は, SDS/PAGE において33kDa, 34kDa, 34.5kDa の3本のバンドを示し, 精製過程で加水分解を受け易いとしている. 以上, ペプチドマップ, 免疫学的交叉性, 陽イオン交換クロマトグラフィーによる溶出パターン, 及び, 加水分解を受け易いなどの性質から, 34k(A)<sub>2</sub>は lipocortin II である可能性が強いが, 更にアミノ酸配列などの検討が必要であろう.

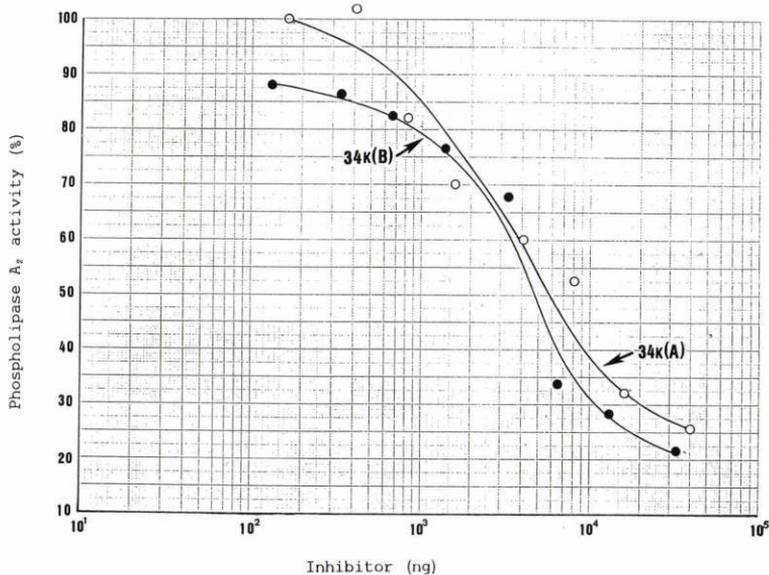


図8 EEP34k(A)及びEEP34k(B)の phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性. 図中の白丸は EEP34k(A), 黒丸は EEP34k(B)を示す.

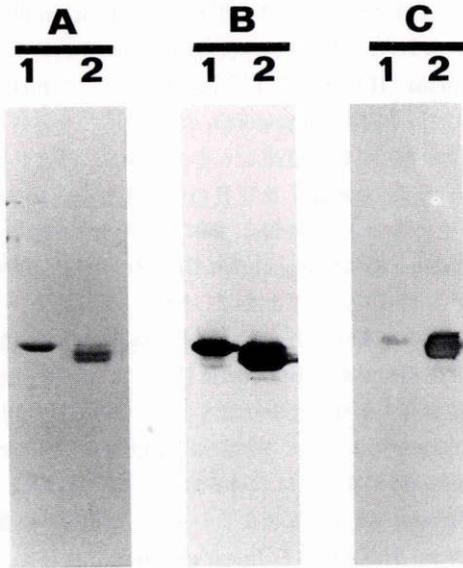


図9 抗リポコルチン I 及び II 抗体による Western-blot  
 A は Coomassie blue によるタンパク染色を示し, B は抗ヒト胎盤リポコルチン I 抗体による Western-blot, C は抗ヒト胎盤リポコルチン II 抗体による Western-blot を示す. Lane 1 は EEP34k(A)<sub>1</sub>, lane 2 は EEP34k(A)<sub>2</sub> を示す.

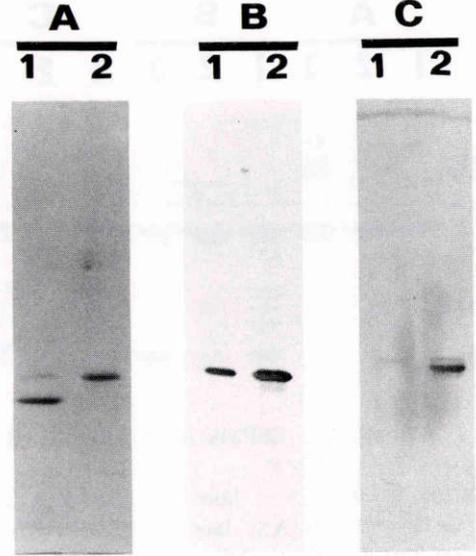


図10 抗リポコルチン I, 及び II 抗体による Western-blot  
 A は Coomassie blue によるタンパク染色を示し, B は抗ヒト胎盤リポコルチン I 抗体による Western-blot, C は抗ヒト胎盤リポコルチン II 抗体による Western-blot を示す. Lane 1 は EEP34k(B)<sub>1</sub>, lane 2 は EEP34k(B)<sub>2</sub> を示す.

表 1

	EEP34k (A) <sub>1</sub>	EEP34k (A) <sub>2</sub>	EEP34k (B) <sub>1</sub>	EEP34k (B) <sub>2</sub>
分子量 (SDS/PAGE)	34kDa	≤34kDa (2本)	34kDaと32kDa (2本)	34kDa
等電点 (NEpHGE)	約7.5	>7.5	?	6.5~6.9 (2個以上)
アミノ酸組成	リポコルチン I, II に類似	?	?	?
ペプチドマップ	(A) <sub>1</sub> と(B) <sub>2</sub> は酷似しているが, (A) <sub>2</sub> は(A) <sub>1</sub> , (B) <sub>2</sub> とは異なる			
免疫学的交叉性				
抗リポコルチン I 抗体	+	+	+	+
抗リポコルチン II 抗体	-	+	-	±

34k(B)<sub>1</sub>は32kDaと34kDaの2種のタンパクの混在物であったが, 34kDa成分は非常に少なく, その等電点の決定や, ペプチドマッピングは行えなかった.

Phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性は34k(A), 34k(B)に共に存在し, 両者の阻害活性はほとんど同等であった. EEP34kの phospholipase A<sub>2</sub>の50%阻害値は, 他臓器より精製された lipocortin における50%阻害値と比較しても大きな差異は見られなかった. Phospholipase A<sub>2</sub>阻害活性の存在によって, 生理活性の面からも,

EEP34kが lipocortin 関連タンパクであると実証された.

以上のように EEP34k には lipocortin が2種以上存在することが明確となったが, では実際に水晶体の中でいかなる機能を担っているのであろうか. lipocortin I が EGF receptor/kinase の基質であることから, 上皮細胞の増殖を制御している可能性, あるいは, 白内障の発生もしくはその抑制などにかかわっている可能性なども考えられ, 臨床面での応用をも含めて今後

の検討が更に必要であろう。

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) **Boumann AA, de Leeuw ALM, Broekhuysen RM**: Lens membranes XII. 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, 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) 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.
- 5) **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.
- 6) **Huang KS, Pepinsky RB, et al**: Two human 35kd inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> are related to substrats of pp60<sup>v-src</sup> and of the epidermal growth factor receptor/kinase. *Cell* 46: 191—199, 1986.
- 7) 太田厚子, 大坂幸英, 中山龍子他: 34kDa EDTA-extractable protein (EEP34k) の精製, 生理活性及び免疫学的検討. *日眼* 92: 2071—2079, 1988.
- 8) **Laemmli UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 9) **O'Farrell PH**: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007—4021, 1975.
- 10) **Cleveland DW, Fisher SG, et al**: Peptide mapping by limited proteolysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252: 1102—1106, 1977.
- 11) **Morrissey JH**: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307—310, 1981.
- 12) **Rothhut B, Russo-Marie F, et al**: Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein "Renocortin". *Biochem and Biophys Res Commun* 117: 878—884, 1983.
- 13) **Davidson FF, Dennis EA et al**: Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by "Lipocortins" and Calpactins. *J Biol Chem* 262: 1698—1705, 1987.
- 14) **Towbin H, Saehelin T, Gordon J**: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350—4354, 1979.
- 15) **Hirata F, Matsuda K, et al**: Phosphorylation at a tyrosine residue of lipomodulin in mitogen-stimulated murine thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4717, 1984.
- 16) **Pepinsky RB, Tizard R**: Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. *J Biol Chem* 263: 10799—10811, 1988.