

牛角膜特異蛋白質の分離とその特性

小 西 裕美子

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

牛角膜には、構成成分であるコラーゲンをはじめとした不溶性蛋白質の他に、可溶性蛋白質が多量に存在する。この可溶性蛋白質で量的に主要なものは、組織特異的な抗原性を有する非血清性蛋白質であるが、角膜におけるその生理活性は不明である。ゲル濾過と陰イオン交換カラムを用いて、牛角膜可溶性画分からこの角膜特異蛋白質（以下 CSP と略する）の分離を試みたところ、既に報告されている分子量 5 万 4 千の画分が分離された。この主要画分はクロマトフォーカシング法により、pH 6.12 から 6.41 の間に 4 種類の等電点をもつポリペプチドの 4 画分に分離された。またマウス抗 CSP モノクローナル抗体をリガンドとして用いたクロマトグラフィーでは、CSP の 4 画分ともに結合性がみられた。これらより CSP は共通の抗原性をもち、ゲル濾過や陰イオン交換において同一の挙動を示すポリペプチド群で、分子多様性を持つことが判明し、しかもそれぞれが分離可能であった。最後に CSP は、糖蛋白質ではないことが、コン A セファローズカラムで示された。（日眼会誌 94 : 1148—1156, 1990）

キーワード：牛角膜可溶性蛋白質，部分精製，モノクローナル抗体，クロマトフォーカシング

Isolation and Characterization of Bovine Cornea-Specific Protein

Yumiko Konishi

Department of Ophthalmology, School of Medicine, The University of Tokushima

Abstract

The abundant soluble protein of bovine cornea (CSP) was partially purified by chromatographies on Sephacryl S-200, DEAE cellulose and agarose to which mouse anti-CSP monoclonal antibody produced by the hybridoma technique was conjugated. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified CSP yielded a single band with a molecular weight of 54,000 daltons. Isoelectric focusing of the CSP yielded four bands of pI 6.41, 6.32, 6.22 and 6.16. Chromatofocusing with PBE 94 (Pharmacia Uppsala Sweden) allowed the separation of these four components of CSP with iso-electric points of 6.28, 5.89, 5.85 and 5.68. In order to biochemically differentiate the four components, we attempted ammonium sulfate fractionation and chromatographies on heparin-sepharose and hydroxylapatite. However, these methods failed to separate the four CSP components. We examined whether the CSP was a glycoprotein or not by Western-blotting with various kinds of biotinylated lectins. Con A and UEA-I appeared to slightly bind the CSP. But CSP was not bound in chromatography on Con A-sepharose. These results suggested that the CSP was not a glycoprotein. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94 : 1148—1156, 1990)

Key words: Corneal soluble protein, Partial purification, Molecular weight, Isoelectric points

別刷請求先：770 徳島市蔵本町 2—50 徳島大学医学部眼科学教室 小西裕美子
(平成元年12月7日受付，平成2年5月1日改訂受理)

Reprint requests to: Yumiko Konishi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, The University of Tokushima.

2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Received December 7, 1989 and accepted in revised form May 1, 1990)

I 緒 言

1973年に Holt と Kinoshita は、牛角膜上皮と実質に含まれる可溶性蛋白質を解析し、共通に存在する非血清性蛋白質を見いだしたり、1981年 Alexander らは、この蛋白質の分離法と生化学的特質を調べ²⁾³⁾、牛角膜可溶性画分中に多量に存在する分子量54,000の蛋白質が、角膜全層、結膜上皮および水晶体前囊細胞に組織特異性をもち、哺乳類に共通した抗原性を示すことを報告した⁴⁾。近年、蚕食性角膜潰瘍など種々の角膜疾患あるいは前眼部どう膜炎を有する患者血清中に、この蛋白質に対する抗体が高率に認められており、角膜自己免疫疾患の病因との関係が考えられる⁵⁾⁶⁾。我々はこの角膜可溶性蛋白質 (Cornea-Specific Protein ; 以下、CSP と略する) を用いてマウスを感作したところ、組織学的に角膜上皮の変性所見 (特にミトコンドリアと粗面小胞体) と抗体沈着が観察された⁷⁾。

この CSP はヒト角膜にも多量に存在するが、そのアミノ酸組成よりコラーゲンやアクチンのような細胞の構成蛋白質とは異なっており²⁾、角膜組織においてなんらかの重要な生物活性を持つと考えられる。今回、CSP の生理的機能解明の糸口とするために、CSP を構成する等電点の異なる4つの成分の分離方法について、生化学的特性より検討した。

II 実験方法

1. CSP の抽出と部分精製

0℃で保存、移送してきた牛眼球より角膜を切除し細片化した。これに湿重量の4倍量の0.1M NaCl/40mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.2を加えて、3分間超音波破碎 (Branson Sonifier Cell Disruptor 185) を行い、10,000×g (Sorvall) で10分間遠心した。さらにこの上清を100,000×g (日立超遠心機55P-2) で60分間遠心し、得られた上清を蒸留水で2倍希釈し、Tween 20を0.02%になるように加えた。この角膜可溶性画分を、20mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.3/0.02% Tween 20で平衡化したセファクリル S-200 (Pharmacia, 2.5×38cm) を用いて流速0.25ml/min でゲル濾過を行った。次に DEAE-セルローズ (Whatman DE-52, 0.7×5.4cm) を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。まずカラムを20mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.3/0.02% Tween 20で平衡化し、ゲル濾過により得られた分画のうち分画番号38, 39, 40を流速0.21ml/min で流し、素通りした画分を集めたのち、50mM NaCl/

20mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.3/0.02% Tween 20で目的とする CSP を溶出した。さらに500mM NaCl/20mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.3/0.02% Tween 20で押し出しを集めた。

蛋白定量はクマジー-BB-G (Bio Rad, Protein assay kit) による色素結合法で測定した。標準曲線は牛血清アルブミンを用いて作製した。

2. クロマトフォーカシング

上記方法により精製した CSP 1.6mg を25mM イミダゾール塩酸緩衝液 pH 7.4に透析した後、同一緩衝液で平衡化した PBE 94 (Pharmacia, 0.7×25cm) に、流速0.2ml/min で添加した。次に蒸留水で8倍希釈したポリバッファー-74-HCl pH 4.5で溶出した。

3. マウスモノクローナル抗体作製

部分精製した CSP 100μg を抗原として、同量のフロイント完全アジュバントと乳化後、8週齢のメスの BALB/c マウスに腹腔内注射して4回感作した。最終感作後、3日目にその脾細胞を採取して、そのリンパ球とマウスミエローマ細胞 (SP-2) とをポリエチレングリコール法で細胞融合させ、HAT 培地でハイブリドーマを選択した⁸⁾。酵素免疫測定法で抗体産生細胞をスクリーニングした。次に限界希釈法でクローニングした抗体産生細胞を、マウス腹腔内で増殖させて、腹水を採取した。得られた腹水に100%硫酸を同量加えて抗体を沈降させ、30,000×g で10分間遠心し、沈澱をダルベッコのリン酸緩衝液 (以下 PBS (-) と略する) で透析した。これに9倍量の3M NaCl/1.5M グリシン-NaOH pH 8.9を加えて、同一緩衝液で平衡化したプロテイン A-セファローズ CL-4B (Pharmacia, 2.5×3.2cm) に流速0.44ml/min で流し、IgG を吸着させた。0.1M クエン酸緩衝液 pH 4.0で溶出し、50mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.3/0.1M NaCl で透析した。

4. 酵素免疫測定法による CSP 定量

上記のように作製したマウスモノクローナル抗体のうち、イムノプロットにより抗 CSP 抗体であることが確認された CSP-A4 (サブクラス IgM) を第一抗体として、アビジン-ビオチン法で測定した。

まず96穴プレートに各画分から100μl を抗原として吸着させたのち、1%ゲラチン/0.1M PBS (-) でブロッキングし、培養上清0.2μl/ゲラチン PBS (-) を結合させ、さらにビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 0.5μg/0.05% Tween 20/PBS (-) を結合させた。これにアビジン-ペルオキシダーゼ (Vector ABC kit ;

AB 試薬各0.2ml)/0.05% Tween 20/PBS (-)を反応させ、0.4mg/ml o-フェニレンジアミン/50mM クエン酸緩衝液 pH 5.0/0.01% H₂O₂を基質としてペルオキシダーゼ反応を行い、405nmの吸収値をマイクロプレートリーダー (Corona MTP-32)で測定した。

5. CSP アフィニティーカラム

得られた12種類のマウス抗CSPモノクローナル抗体のうち、CSPに対する抗原抗体結合能の強いCSP-A3を用いて、アフィニティーカラムを作製した。まず、プロテインAで精製した4.2mgのCSP-A3を0.1M 3-(N-モルフォリン)プロパン硫酸 pH 7.5で透析したのち、7mg/mlに濃縮した。次にアガロースの活性エステル (Bio Rad Affi-Gel 10) 0.2mlと4℃で4時間反応させ、カップリングを行った。さらに1.0M グリシンエチルエステル pH 8.0を1/10容加えて、4℃で1時間反応させ、残存している活性化エステル基をブロックした。これを2.5mlの注射筒につめ、PBS(-)/0.1% NaN₃で十分に洗浄した。

作製したカラムをPBS(-)で十分に洗浄したのち、PBS(-)に透析した角膜可溶性画分4.32mgを流速0.07ml/minで流して、CSPを吸着させた。さらにPBS(-)で洗浄し、0.6M NaCl/0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 9.6で溶出したのち、さらに1.0M NaCl/0.05M 炭酸緩衝液 pH 10.7で溶出した。

6. 分子量・等電点測定

ゲル濾過およびアフィニティーカラムにより精製したCSP (0.2μg)をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (8~25%グラジエントゲル)にかけて分子量を測定した。等電点測定のためには、ゲル等電点電気泳動 (IEF 5-8)に同じ精製CSP 0.6μgを適用した。泳

動後、クマジーBB-Rで染色し、レーザーデンストメーター (Pharmacia LKB 2400 Gelscan XL)を用いて解析した。

7. 各種レクチンとの反応性

ウェスタンブロットを行うために、分子量マーカーと、ゲル濾過と陰イオン交換クロマトグラフィーで部分精製したCSP 0.1μgを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (8~25%グラジエントゲル)で分離し、25mM トリス/192mM グリシン/20%メタノール中に浸し、ニトロセルロース膜に転写した。0.1%BSA/PBS(+)/0.5M NaClでブロッキングし、各種ビオチン化レクチン10μg/5ml PBS(+)/0.05% Tween 20を反応させた。PBS(+)/0.05% Tween 20で洗浄し、アビジン-ペルオキシダーゼ (Vector ABC Kit; AB 試薬各0.05μl)/PBS(+)/0.05% Tween 20を反応させ、0.2mg/ml 3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl/50mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.4/0.01% H₂O₂を基質としてペルオキシダーゼ反応を行った⁹⁾。

用いたレクチンはビオチン化レクチン・キットI (Vector)に含まれるハリエニシダ (UEA-I), タチナタマメ (Con A), コチギノイ (WGA), ダイズマメ (SBA), ヒマ (RCA), ドリコスマメ (DBA)のレクチンである。対照として、ビオチン化レクチンを含まない緩衝液のみを反応させた陰性実験と、ラット抗CSPポリクローナル抗体 (精製IgG 5μg)を反応させた陽性実験を行った。

コンA-セファローズ4B (Pharmacia)を用いるCSPの精製には、PBS(+)/0.05% Tween 20/0.5M NaClで平衡化したカラム (0.7ml)に、同一緩衝液に透析した未精製の角膜可溶性画分1.0mgを、流速0.12ml/

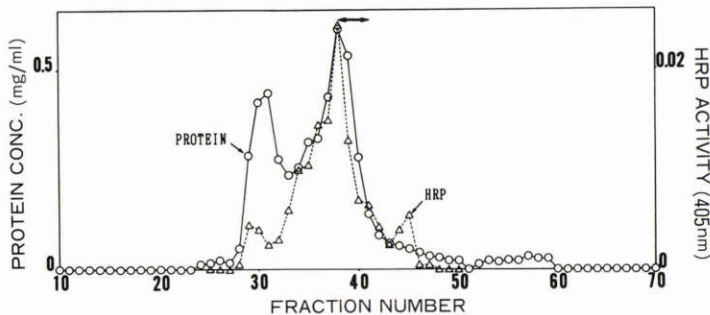


図1 セファクリルS-200による角膜可溶性画分のゲル濾過。横軸はゲル濾過による分画番号を、縦軸の○は蛋白質濃度を、△は酵素免疫測定法によるCSP濃度を405nmの吸光度で示す。矢印に示す分画番号38~40を集めて、次の陰イオン交換クロマトを行った。HRP: horse radish peroxidase

min で流して吸着させた。十分に洗浄したのちに、0.1 M ホウ酸で溶出した¹⁰⁾。

III 結 果

1. CSP の抽出と部分精製

超遠心で得られたウシ角膜可溶性画分の蛋白質濃度は2.0~2.5mg/ml で、そのうちCSP 含量は約30%であった。抽出時に超音波破碎を行わない場合は、蛋白質濃度1.0mg/ml 前後で、CSP 含量約35%であった。角膜の細片化や超音波破碎を行わずに、2-メルカプトエタノール、EDTA、SDS を加えたトリス緩衝液中で静置したのち超遠心を行うだけでも、4~5mg/ml の蛋白質が得られた。しかし水不溶性の膜蛋白質なども可溶化されるため、CSP 含量は10~15%であった。またウシ角膜より抽出した可溶性画分は凝集しやすい性質があるため、緩衝液の pH を等電点の約6.0よりもアルカリ側の7.5~8.5に調整し、さらに Holt と Kinoshita¹⁾および Alexander ら²⁾³⁾は抽出後に界面活性剤を加えていないが、凝集予防のために低濃度の界面活性剤を加えた方が安定化される。特に蛋白質の変性作用が温和で、イオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動に影響を与えない非イオン性界面活性剤が有用である。今回用いた Tween 20は他の非イオン性界面活性剤に比べて臨界ミセル濃度が高いため、低温での操作でミセルを形成しにくく、ゲル濾過や透析により容易に除去できる利点がある。

セファクリル S-200によるゲル濾過では、図1の○で示すように、大きな2つの蛋白質のピークが認められ、2番目のピークにはほぼ一致して△で示す酵素免疫測定法による CSP のピークが認められた。また図2の

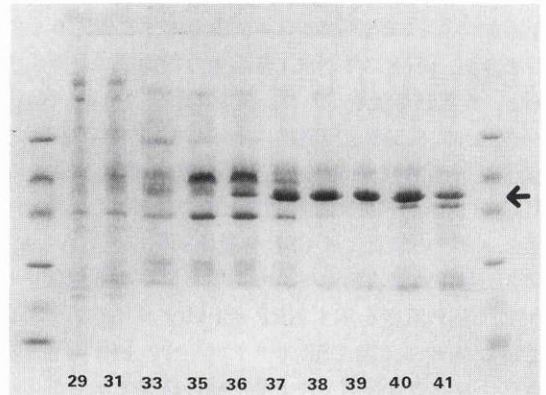


図2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるゲル濾過画分の蛋白質解析。ゲル濾過で得られた各画分の試料に9倍量のアセトンを加えて、-25℃で蛋白沈澱を行い、蛋白濃度2.0mg/ml に調整したのち、各0.3μg を SDS-ポリアクリルアミドゲル(8~25%グラジエントゲル, Pharmacia) を用いて電気泳動し、クマジーBB-R で染色した。各レーン下の数字は分画番号を、矢印は分子量54,000の蛋白質の位置を示す。両端には分子量マーカーを泳動してある。

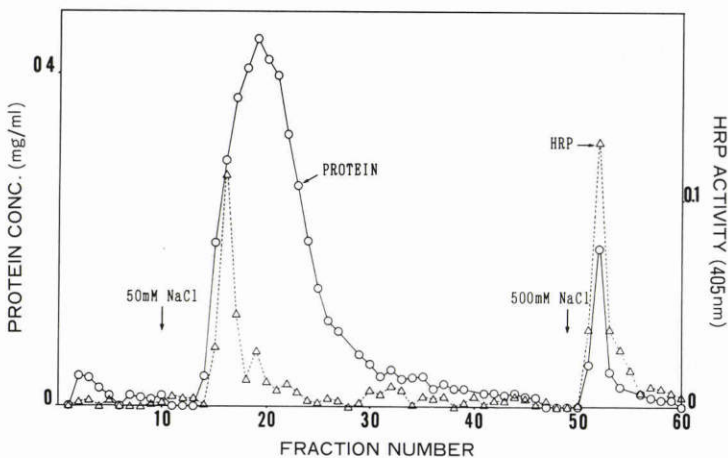


図3 DEAEセルローズによるゲル濾過後の可溶性画分の陰イオン交換クロマトグラフィー。横軸は陰イオン交換による分画番号を、縦軸の○は蛋白質濃度を、△は酵素免疫測定法による CSP 濃度を405nm の吸光度で示す。NaCl 濃度を分画番号10で50mM に、分画番号49で500mM にした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でも、2番目のピークの35~41に分子量54,000のCSPのバンドが認められた。

図1の矢印で示した画分の蛋白質を集めて、DEAE-セルローズによる陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。平衡化緩衝液をpH 7.4として、50mM NaClを添加すると、CSPはカラムに吸着せずに素通りしてしまうが、pH 8.3でNaCl無添加の緩衝液で平衡化すると、大部分が吸着された。図3に示すように、NaClを0, 0.05, 0.5Mと段階的に上げてCSPを溶出した。塩濃度0.05Mで約60%のCSPが溶出され、図4のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果から、デントメーターの解析よりCSP含量は80%以上であった。図3で第1の蛋白質ピークの初期と第2の蛋白質ピークに、CSP濃度を示すHRP activityがピークを示しているが、ラット抗CSPポリクローナル抗体を第一抗体とする酵素免疫測定法でも同様の結果を示した。しかし分画番号15~24の等電点電気泳動の結果は、同一のパターンを示す4本の蛋白質のバンドが認められた。これはCSPが等電点以外に抗原性の異なる蛋白質の集合体よりなり、抗体との親和性に違いがあるためと考えられる。またピーク2(分画番号52)は、塩濃度が高く濃縮ゲルより泳動されなかったため、脱塩後の



図4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるDEAE-セルローズ画分の蛋白質解析。陰イオン交換で得られた各画分の試料に9倍量のアセトンを加えて、 -25°C で蛋白沈澱を行い、蛋白濃度 2.0mg/ml に調整したのち、各 $0.3\mu\text{g}$ をSDS-ポリアクリルアミドゲル(8~25%グラジエントゲル, Pharmacia)を用いて電気泳動し、クマジー-BB-Rで染色した。各レーン下の数字は分画番号を、矢印は分子量54,000の蛋白質の位置を示す。両端には分子量マーカーを泳動してある。

泳動結果を示しているが、分子量54,000のバンドが僅かに認められるのみである。これに対してHRP activityが高値を示した理由としては、第2抗体であるビオチン化ウマ抗体の非特異的反応、あるいは共通した抗原性を持つ分子量の異なる蛋白質の存在が考えられる。

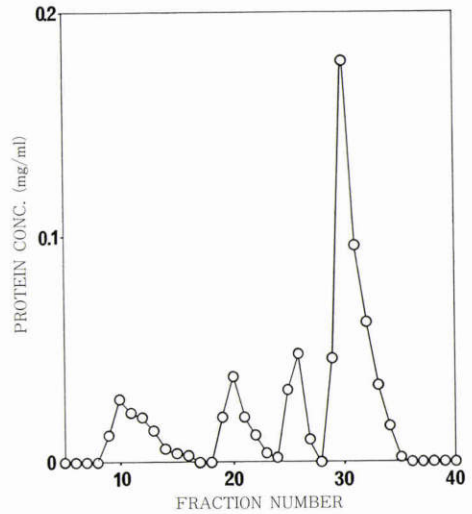


図5 PBE94によるゲル濾過および陰イオン交換後の可溶性画分のクロマトフォーカシング。横軸は分画番号を、縦軸は蛋白質濃度を示す。

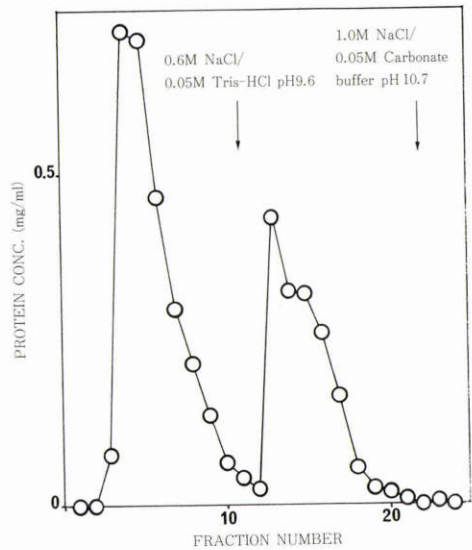


図6 マウス抗CSP抗体による未精製角膜可溶性画分のアフィニティークロマトグラフィー。横軸は分画番号を、縦軸は蛋白質濃度を示す。

表 1 ゲル濾過および陰イオン交換による CSP 部分精製

	容 量	蛋白質濃度	総蛋白量	CSP 含量	CSP 収率
超遠心上清	4.0 (ml)	2.41 (mg/ml)	9.63 (mg)	28 (%)	100
ゲル濾過	10.0	0.464	4.64	48	83
陰イオン交換	5.9	0.347	2.05	82	62

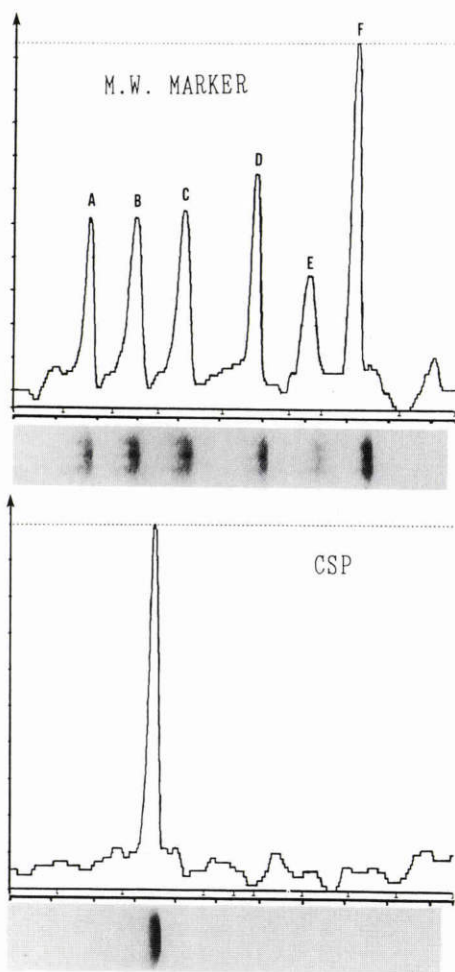


図 7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による CSP の分子量測定。上段に分子量マーカー，下段にゲル濾過およびアフィニティーカラムにより部分精製した CSP の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のゲルと，デンストメーターによる測定結果を示す。分子量マーカーは，Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia) を使用した。
 A: Phosphorylase b (94,000), B: Albumin (67,000), C: Ovalbumin(43,000), D: Carbonic anhydrase (30,000), E: Trypsin inhibitor (20,100), F: α -Lactalbumin (14,400) : () 内は各分子量を表す。

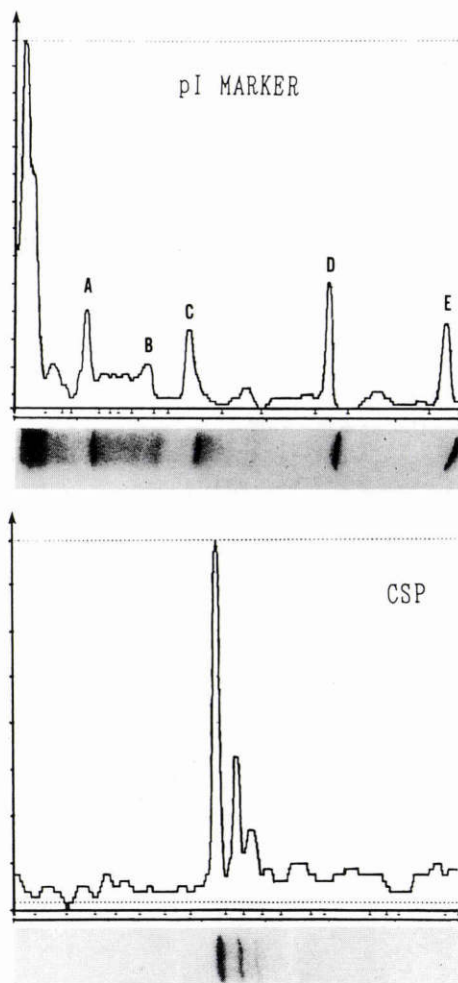


図 8 ゲル等電点電気泳動による CSP の等電点測定。上段に等電点マーカー，下段にゲル濾過およびアフィニティーカラムにより部分精製した CSP のゲル等電点電気泳動のゲルとデンストメーターによる測定結果を示す。等電点マーカーは，High pI Callibration Kit (ph5-10.5 pharmacia) を使用した。
 A: Horse myoglobin-basic band (7.35), B: Horse myoglobin-acidic band (6.85), C: Human carbonic anhydrase B (6.55), D: Bovine carbonic anhydrase B (5.85), E: β -Lactoglobulin A (5.20) : () 内は各等電点を表す。

牛角膜1.2gから、ゲル濾過および陰イオン交換による部分精製で得られるCSPの収量と収率は表1に示す。

Pharmacia PBE 94を用いたクロマトフォーカシングでは、図5に示すように小さな3つのピークに続いて大きなピークが認められた。各ピークの大きさは、最初の粗標品である角膜可溶性画分の違いによって差異があったが、電気泳動により各ピークに異なる等電点をもつ分子量54,000の蛋白質のバンドが認められた。溶出液であるPolybuffer 74の影響で、各蛋白質の正確な等電点は測定できなかったが、その溶出時の緩衝液のpHは、6.28, 5.89, 5.85, 5.68であった。

マウス抗CSPモノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティーカラムによる結果を図6に示す。溶出液0.6M NaCl/0.05M トリス塩酸緩衝液pH 9.6で、目的とするCSPの大部分が溶出された。また分子量73,000と28,000の蛋白質の非特異的吸着がみられたが、ゲル濾過により除去可能であった。

2. CSPの分子量と等電点

ゲル濾過とアフィニティーカラムにより精製したCSPと分子量マーカーのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図7に示す。上段の分子量マーカーの各泳動距離から作成した標準曲線より、分子量はAlexanderらの報告と同じ、54,000であった。

また、ゲル濾過とアフィニティーカラムにより精製したCSPと等電点マーカーのスラブゲル等電点電気泳動の結果を、図8に示す。上段の等電点マーカーの各泳動距離より作製した標準曲線より、CSPの等電点

は6.41, 6.32, 6.22, 6.16と、Alexanderらの報告より低い値が得られた。

3. レクチンとの反応性

ウェスタンブロットの結果を図9に示す。精製CSPは、WGA, SBA, RCA, DBAとは全く反応しなかった。UEA-IとCon Aとは弱いが反応が認められた。この反応はビオチン化レクチンの量を増加しても変わらず、UEA-Iでは分子量マーカーのphosphorylase b, carbonic anhydraseと同じぐらいの反応が認められた。Con Aでは卵アルブミンが強く染色され、CSPはcarbonic anhydraseと同程度の弱い反応が認められた。

コンA-セファローズによる精製では、角膜可溶性画分全蛋白質の5%が吸着し、溶出された。溶出された蛋白質をアセトン沈澱により濃縮し、電気泳動を行った結果、分子量31,000, 17,300, 14,600の蛋白質が認められたが、CSPは吸着されなかった。

IV 考 按

Alexanderらは陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて部分精製したCRPを、さらにSDSディスクゲル電気泳動で純化した³⁾。しかし彼らの方法では泳動後のゲルからの蛋白質の回収率が悪く、電気泳動による蛋白質の高次構造の変化を免れない。また彼らは分子量のみで分離しているため、等電点の異なる4つの蛋白質の混合物を分離していると考えられる。この4つの主要成分の分離には、ディスク等電点電気泳動あるいはクロマトフォーカシングが必

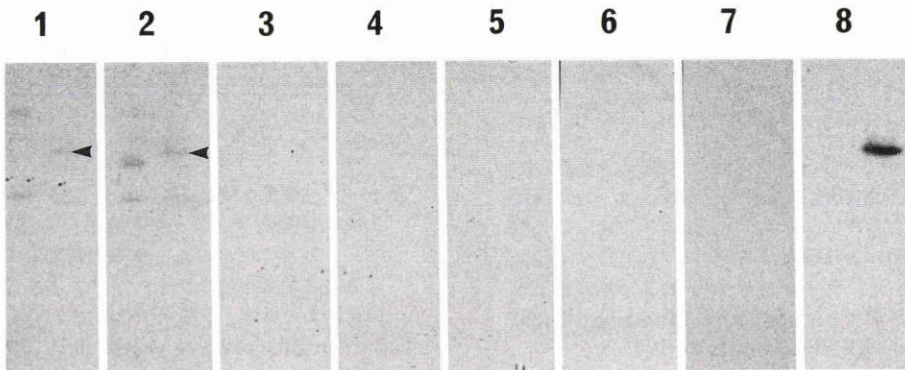


図9 各種ビオチン化レクチンによるCSPウェスタンブロット。各レーン右にゲル濾過による部分精製CSPを、左に分子量マーカーを電気泳動している。

1: UEA-I, 2: Con A, 3: WGA, 4: SBA, 5: RCA, 6: DBA, 7: negative control, 8: positive control

要である。ディスク等電点電気泳動では、互いの等電点が非常に近似しているため、完全な分離はできなかった。これに比較して、クロマトフォーカシングはCSPの各主要成分の分離精製に有用であった。

またエタノールやアセトンなどの有機溶媒を用いての蛋白質の分別沈降は、脂溶性物質の除去に有用であるが、CSPを含む大部分の蛋白質が凝集し、長時間その溶媒に触れると、高濃度の還元剤と界面活性剤などの蛋白変性剤を多量に加えないと可溶化できない。これに比べて硫酸による塩析では、CSPの分別沈降はできないが、60%濃度ではほとんどの蛋白質が沈降し、可溶化も容易である。従ってCSPの濃縮に適していると考えられる。

以上の結果より、まず細片化した牛角膜片に弱アルカリ性の緩衝液を加え超音波破碎し、超速心にて可溶性画分を抽出したのち、飽和硫酸を60%濃度になるように加え、蛋白成分を沈降させ濃縮する。次に低濃度の非イオン性界面活性剤を含む緩衝液を用いてゲル濾過を行う。この部分精製標品を、イオン交換クロマトグラフィーと抗CSP抗体アフィニティーカラムおよびクロマトフォーカシングを用いて精製することにより、CSPを構成する4つの主要成分を分離し純化できると考えられる。通常のカラムクロマトグラフィーよりも分離能と再現性の優れた高速液体クロマトグラフィーを用いれば、より容易に短時間で純化が可能と思われる。

この4つの主要成分は、ゲル濾過とイオン交換において同一の挙動を示す、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においても一本のバンドとして認められる。またマウス抗CSPモノクローナル抗体との結合性を調べると、共通した抗原性を有することが判明した。また今回データは示さないが、ヘパリン-セファロースおよびハイドロキシルアパタイトとの反応性を調べたが、CSP主要成分の間に結合性の差異は認められなかった。これらのことより4種のCSPは非常に類似した構造をもつポリペプチドと考えられる。

また陰イオン交換で、第2の蛋白質ピークに高いHRP活性が認められることより、凝集体の形成やC末端領域の開裂などによる、分子量の異なる類似蛋白質の存在も考えられる。しかしHoltとKinoshitaおよびAlexanderらは精製したCSPを電気泳動し、PAS染色を行うと陰性であったことより、CSPは糖蛋白質ではないと報告しており¹³⁾、今回コンA-セファロースとの結合性をみると、ウェスタンブロット

でUEA-IとCon Aとに認められるバンドは非特異的反応と考えられ、配糖体形成に伴う分子多様化は除外できるが、さらに検討する必要がある。今回の実験では究明できなかったが、今後分離可能となったCSP各主要成分のアミノ酸組成・配列の差を調べていく必要がある。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と論文原稿の御校閲をいただいた徳島大学眼科学教室三村康男教授と徳島大学生化学教室山本尚三教授に深謝いたします。

なお、本研究は平成元年度文部省科学研究費補助金(課題番号01480417)の補助を受けた。付記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Holt WS, Kinoshita JH: The soluble proteins of the bovine cornea. Invest Ophthalmol 12: 114-126, 1973.
- 2) Alexander RJ, Silverman B, Henley WL: BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl) 19: 186-187, 1980.
- 3) Alexander RJ, Silverman B, Henley WL: Isolation and characterization of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. Exp Eye Res 32: 205-216, 1981.
- 4) Silverman B, Alexander RJ, Henley WL: Tissue and specificity of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. Exp Eye Res 33: 19-29, 1981.
- 5) Kruit PJ, Gaag, vdR, Broersma L, et al: Autoimmunity against corneal antigens. I. Isolation of a soluble 54 Kd corneal epithelium antigen. Curr Eye Res 5: 313-320, 1986.
- 6) Eype AA, Kruit PJ, Gaag vdR, et al: Autoimmunity against corneal antigens. II. Accessibility of the 54 Kd corneal antigen for circulating antibodies. Curr Eye Res 6: 467-475, 1987.
- 7) 小西裕美子, 真鍋佳永, 石丸裕晃, 他: 角膜特異蛋白質の抗原性の研究. 眼紀 40: 2708-2713, 1989.
- 8) Goding JW: Antibody production by hybridomas. Immunol Methods 39: 285-308, 1980.
- 9) Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RC: Detection of glycosylated polypeptides in human aqueous humor by lectin-binding analysis. Exp Eye Res 49: 271-279, 1989.

10) **Kennedy JF, Rosevear A** : An assessment of the fractionation of carbohydrates on concanavalin A-sepharose 4B by affinity chromato-

graphy. *J Chem Soc [Perkin Trans I]* 19 : 2041-2046, 1973.
