

いて検討<sup>2.1)</sup>し、コルチ器内の局在部位についても検討<sup>2.2)</sup>した。さらにモルモットに加えて、ラット、マウスなど他の哺乳類のコルチ器についても、この蛋白質の存在を検討<sup>2.2)</sup>した。

## 対象および方法

### 1、組織採取

対象にはプライエル反射正常な有色モルモット（体重250～350 g）、ラットおよびマウスを用いた。ペントバルビタール（ネンブタール<sup>®</sup>33 mg/kg）で腹腔内麻酔を行った後に断頭した。直ちに側頭骨を採取し、軟部組織を除いた後に、液体窒素により融解点にまで冷却されたFreon-12中に浸した。この後-40℃で約5日間凍結乾燥を行った。コルチ器およびコルチ器以外の内耳組織の採取は、湿度40%以下に維持された常温室内において立体顕微鏡下に行った。モルモットのコルチ器については一部のサンプルを、内有毛細胞を含むInner Layerと、外有毛細胞を含むOuter Layerとに分離した。Outer Layerはさらに、外有毛細胞と支持細胞とに分離し、Inner Layerは内有毛細胞と柱細胞とに分離した<sup>2.3)</sup>（図1）。また、モルモットの一部のサンプルでは、耳石器の平衡斑である球形囊斑、および卵形囊斑を採取した。

### 2、非変性等電点電気泳動法

凍結乾燥を行った組織を蒸留水にて溶解し、遠心分離を行った。この上清を取り出し、2倍濃度のサンプル溶液（60% glycerol(v/v), 4% ampholytes (2.5% pl;3.5-10, 1.25% pl;3-5, 0.25% pl;2.5-4))を同量加えてサンプルとした。サンプルをsodium dodecyl sulfate（以下SDS）を含まない非変性の状態にて、5.5% アクリルアミドのゲル（5.5% polyacrylamide, 10% glycerol(v/v), ampholytes(3.75% pl;3.5-

10, 1.88%pl;3-5, 0.37%pl;2.5-4)) 上で等電点電気泳動を行った。電気泳動装置はHoefer Scientific Instruments(San Francisco, CA)製のHoefer SE 600 vertical slab unit (ゲルの大きさ:14×16 cm; 厚さ:1.5 mm) を使用し、サンプル泳動に先立ち15 W で15分間の予備泳動を行った。また、0.02 M acetic acidと0.02 M NaOHとを、各々anolyte、catholyteとして用いた。電気泳動は15 W一定で150分間15℃で行った。等電点の指標にはbroad pl calibration kit; pH 3-10 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いた。電気泳動後、一部のゲルは銀染色を行い<sup>2,4)</sup> 一部のゲルはアミノ酸配列分析およびWestern Blotに用いた。

### 3、アミノ酸配列分析

#### (1) N-末端側アミノ酸配列分析

乾燥重量約200  $\mu$ gのモルモットのホルチ器をサンプルとして非変性等電点電気泳動を行った。ゲルを0.02%クマシーブルーにて染色した後、さらに特殊な膜 Immobilon-P<sup>sq</sup> membrane<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA) に電氣的に転写<sup>2,5)</sup> した。電氣的膜転写にはHoefer TE-22 Transfer Electrophoresis unitを用いて、90 V一定で2時間行った。CBP-15のバンドを膜から切り取り、trifluoroacetic acid (以下TFA) にて処理<sup>2,6)</sup> した後に、Model 470A gas-phase sequenator (Applied Bio-Systems, Foster City, CA) にて分析した。得られたアミノ酸配列の分析には次のデータベースを用いた。

Non-redundantPDB, Swiss Prot, PIR,  
SPUdate, GenPept, GUpdate databases

#### (2) 蛋白質分解酵素法; 中間アミノ酸配列分析

乾燥重量約1000  $\mu$ gのモルモットのホルチ器をサンプルとして非変性等電点電気泳動を行った。ゲルを

0.2%クマシーブルーにて染色した後、CBP-15のバンドを切り取り、equilibration buffer (0.125 M Tris-HCl; pH 6.8, 0.1%SDS, 10%glycerol, 15 mM DTE, 0.01%bromophenol blue, 1 mM EDTA) で30分間処理した。その後、切り取ったゲルを別に用意していたSDSを含む平板ゲル (18%アクリルアミドゲル; 大きさ:14×16 cm, 厚さ:1.5 mm; Hoefer社製 上記) 上に置き、蛋白質分解酵素の一つである *Staphylococcus aureus* V8 protease (15  $\mu$ g) を加えて電気泳動を行った<sup>27)</sup>。電気泳動は泳動先端が stacking gelとseparating gelとの境界に達するまでは50 V一定で行い、その後30分間電圧を切った後200 V一定で行った (終了までに17時間30分要した)。電気泳動後Immobilon-P<sup>SO</sup> membrane<sup>®</sup>に電氣的に転写し、0.1%クマシーブルーにて染色した。得られたペプチド断片のバンドを切り取り、sequenatorにて分析した。

#### 4. Western Blot

モルモット、ラットおよびマウスのコルチ器 (乾燥重量各15  $\mu$ g) をサンプルとして非変性等電点電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。アミノ酸配列分析の結果に基づき、カルシウム結合性蛋白質の一つparvalbuminのサブタイプであるOMに対するモノクローナル抗体1A10 (1:10 dilution)、およびポリクローナル抗体Rabbit  $\alpha$ -OM anti-serum (1:1000 dilution) (いずれもミズーリ州立大学 Michael T Henzl氏より) を一次抗体として用いた。二次抗体には alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (1:1000 dilution)、および anti-rabbit IgG (1:1000 dilution) を使用し、NBT/BCIPにて発色させた。また、positive control として recombinant oncomodulin (以下r-OM;

Michael T Henzl氏より) を使用し、negative controlとして一次抗体にそれぞれ、マウス、家兎の血清を使用した。

#### 5、Mass Spectrometry

モルモットのゴルチ器 (乾燥重量100  $\mu$ g) を用いて、非変性等電点電気泳動に続いてImmobilon-CD membrane<sup>®</sup>への電氣的転写を行った。negative staining<sup>2,8)</sup>を行った後、CBP-15に相当する部位を切り取り、小片に刻み0.1%TFA、30% acetonitrile (AcCN) で処理した。50°Cで3時間インキュベートし、その上清をMass Spectrometryのサンプルとして用いた。Mass Spectrometryは、ワシントン大学 Chemistry Labo.の協力により行った。

### 結果

#### 1、アミノ酸配列分析

モルモットCBP-15のN-末端側および中間アミノ酸配列分析の結果は図2に示す通りで、すでに報告されているラットおよびヒトのOMに対して高い相同性を示した。N-末端側アミノ酸は、得られた16個のうち数カ所で複数個の候補が考えられた。第一候補のアミノ酸のみではラットのOMと8個(50%)、ヒトのOMと9個(56%)が同一で、第二候補のアミノ酸も含めると13個(81%)がラットおよびヒトのOMと同一であった。

蛋白質分解酵素の一つであるV8 proteaseを用いてCBP-15をペプチド断片化して得られた中間アミノ酸配列では、得られた17個のアミノ酸全てがラットおよびヒトのOMと同一であった。これらを合わせると、今回得られたモルモットのCBP-15のアミノ酸配列は、第一候補のアミノ酸のみでラットのOMと76%、ヒトのOMと79%が同一で、第二候補のアミノ酸も含めると91%がラットおよびヒトのOMと同じであった。