

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 μ g) を用いて、非変性等電点電気泳動に続いてImmobilon-CD membrane[®]への電氣的転写を行った。negative staining^{2,8)}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。

2、Western Blot

モルモット、ラットおよびマウスのコルチ器、各15 μ g (乾燥重量) を用いて行った等電点電気泳動においては、いずれにおいてもCBP-15に相当するバンドが銀染色により認められた (図3-A)。これらのバンドは positive controlとして用いたr-OMとともに、モノクローナル抗体1A10 (図3-B)、およびポリクローナル抗体Rabbit α -OM anti-serumいずれに対しても、特異的に反応した。各種差間ではほぼ同程度の反応が認められた。negative controlとして、一次抗体にそれぞれマウス、家兎の血清を用いた群ではCBP-15との反応は認められなかった。

また、モルモットのコルチ器を外有毛細胞を含む Outer Layerと内有毛細胞を含むInner Layerとに分離し、さらに外有毛細胞、支持細胞、内有毛細胞とに分離して各15 μ g (乾燥重量) で等電点電気泳動を行ったが、外有毛細胞において有意に強くCBP-15のバンドが認められた (図4)。内有毛細胞、および支持細胞においても極めて弱いバンドが認められたが、立体顕微鏡下の作業の限界を考えると、サンプルのコンタミネーションの可能性が考えられる。ラセン神経節、ラセン靱帯、血管条、ラセン板縁、卵形嚢、球形嚢などには認められなかった (図5)。

3、Mass Spectrometry

Mass Spectrometryではアミノ酸配列分析までの結果は得られなかったが、CBP-15の分子量測定では12,090と12,370 とにピークが認められた (図6)。Positive controlとして同様に行ったr-OMの結果12,420とほぼ一致していた。また、文献的に報告^{29, 30)}されているOMの分子量11,500~12,000に極めて近い値であった。