

抗組換え39K抗体を用いたウエスタンブロット法による 39K (アネキシン I) の系統発生的分布

佐藤 英介*・杉野 泰生**・森下 誠治*・小林 純郎***・内海 耕慥*

(*高知医科大学生物学教室・**高知大学理学部生物学教室・***新居浜基礎医学研究所)

Phylogenic Distribution of 39K (Annexin I) Protein in Various Organs detected by Western Blotting using Anti-recombinant 39K Protein Antibody

Eisuke F. SATO*, Yasuo M. SUGINO**, Seiji MORISHITA*

Sumio KOBAYASHI***, and Kozo UTSUMI*

Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Nankoku-shi, Kochi 783, Japan ; **Department of Biology, Faculty of Science, Kochi University, Kochi-shi, Kochi 780, Japan ; and *Niihama Medical Institute, Niihama-shi, Ehime 792, Japan*

Abstract. Phylogenic distribution of 39K protein in various organs was studied by western blot analysis using anti-recombinant 39K protein antibody. In guinea pig, 39K protein was distributed in polymorphonuclear leukocyte (PMN), heart, lung, spleen, kidney, urinary bladder, stomach, skin, and placenta. Similar distribution was also observed in frog, teleost, and ray. However, the immunological reactions with anti-recombinant 39K protein antibody in teleost and ray were weaker than that of frog. On the contrary, no detectable distribution was observed in invertebrates. From these results, it is concluded that the annexin I detected by anti-recombinant 39K antibody distributed in various organs of vertebrates, especially in higher animals.

緒言

39K は、モルモット好中球の細胞質内に存在する Ca^{++} 依存性に酸性リン脂質を含む膜へ結合する分子量39kDa のアネキシンタンパク質である¹⁻³⁾。アネキシンは、現在までアネキシン I-X までの十群が報告されているタンパク質であり、 Ca^{++} 依存性に酸性リン脂質を含む膜へ結合し、ホスホリパーゼ A_2 を抑制し、アクチンと Ca^{++} 依存性に結合するという共通した性質をも

つことが良く知られている^{4,5)}。このタンパク質は、様々な方面から研究され、抗炎症作用⁶⁾、膜融合あるいは膜凝集作用⁷⁾、膜電位依存性のCa⁺⁺チャンネル作用⁸⁾などの機能をもち、その名前もリポコルチン、カルパクチン、シネキシン、エンドネキシンなど様々に呼ばれていたが、最近になってCrumptonとDedmanの提唱により多くのこの方面の研究者の同意を得てアネキシンと統一して呼ばれるようになった⁹⁾。しかし、この様な*in vitro*での多機能性は示されているが、このタンパク質の持つ生体内の本来の生理機能はなお明らかにされていない。当初アネキシンは、哺乳類にその分布が限られると考えられていたが、最近になって、ショウジョウバエ¹⁰⁾のみならずカイメン¹¹⁾、そして植物細胞であるトマト細胞¹²⁾、さらには粘菌¹³⁾においてもアネキシン様タンパク質の存在が認められている。我々が分離した39Kは、cDNAクローニングの結果からアネキシンIに属するタンパク質であることが明らかとなった¹⁾。我々は、これまでに抗39K抗体を用い、それがモルモット各組織において好中球に特異的に大量に存在すること、そしてその他の種においてもヒト、ラットの好中球に分布していることを明らかにしてきた¹⁴⁾。本研究では、39Kの分布をさらに明らかにするため、組換え39Kに対するポリクローナル抗体を作成し、ウエスタンブロット法により系統発生的に哺乳類から両生類、魚類、及び種々の生物について検討した。

材料と方法

動物は、脊椎動物門のなかで哺乳類としてヒト(human, *Homo sapiens*)、モルモット(guinea pig, *Cavia porcellus*)、ラット(rat, *Rattus norvegicus*)、両生類としてウシガエル(frog, *Rana catesbeiana*)、爬虫類としてクサガメ(tortoise, *Geoclemys reevesii*)、魚類として硬骨魚類のイシダイ(teleost, *Oplegnathus fasciatus*)と軟骨魚類のアカエイ(ray, *Dasyatis akajei*)を用いた。また、原索動物門のなかでホヤ類としてシロボヤ(ascidian, *Styela plicata*)を用いた。その他の動物としては棘皮動物門のヌノメイトマキ(starfish, *Asterina batheri*)、節足動物門のフナムシ(seq-slater, *Ligiq exotica*)、環形動物門のウマビル(leech, *Whitmaniapi-gra*)、星口動物門のサメハダホシムシ(peanut worm, *Phascolosma scolops*)、軟体動物門のアサリ(bivalve, *Tapes philippinarum*)、海綿動物門のダイダイイソカイメン(sponge, *Halichondria japonica*)を用いた。これらを系統樹で見ると、それぞれFig. 1の四角で囲まれたところに当たる。またその他に、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)と大腸菌(*Escherichia coli*)も用いた。

試料の調製：これらの生物のうち、脊椎動物門のものは各種臓器別に試料を作成し、その他のものは個体ごとに試料を作成した。すなわち臓器あるいは個体をハサミでよくスライスし、その後25 mM Hepes-HCl (pH 7.4)、100 mM KCl に 1 mM EGTA、1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)、0.01% Leupeptin を含む緩衝液中でテフロンホモゲナイザーにより4°C、10分間ホモゲナイズした後、4°C、10分間、5000 rpm 遠心し、その遠心上清(post-nuclear frac-

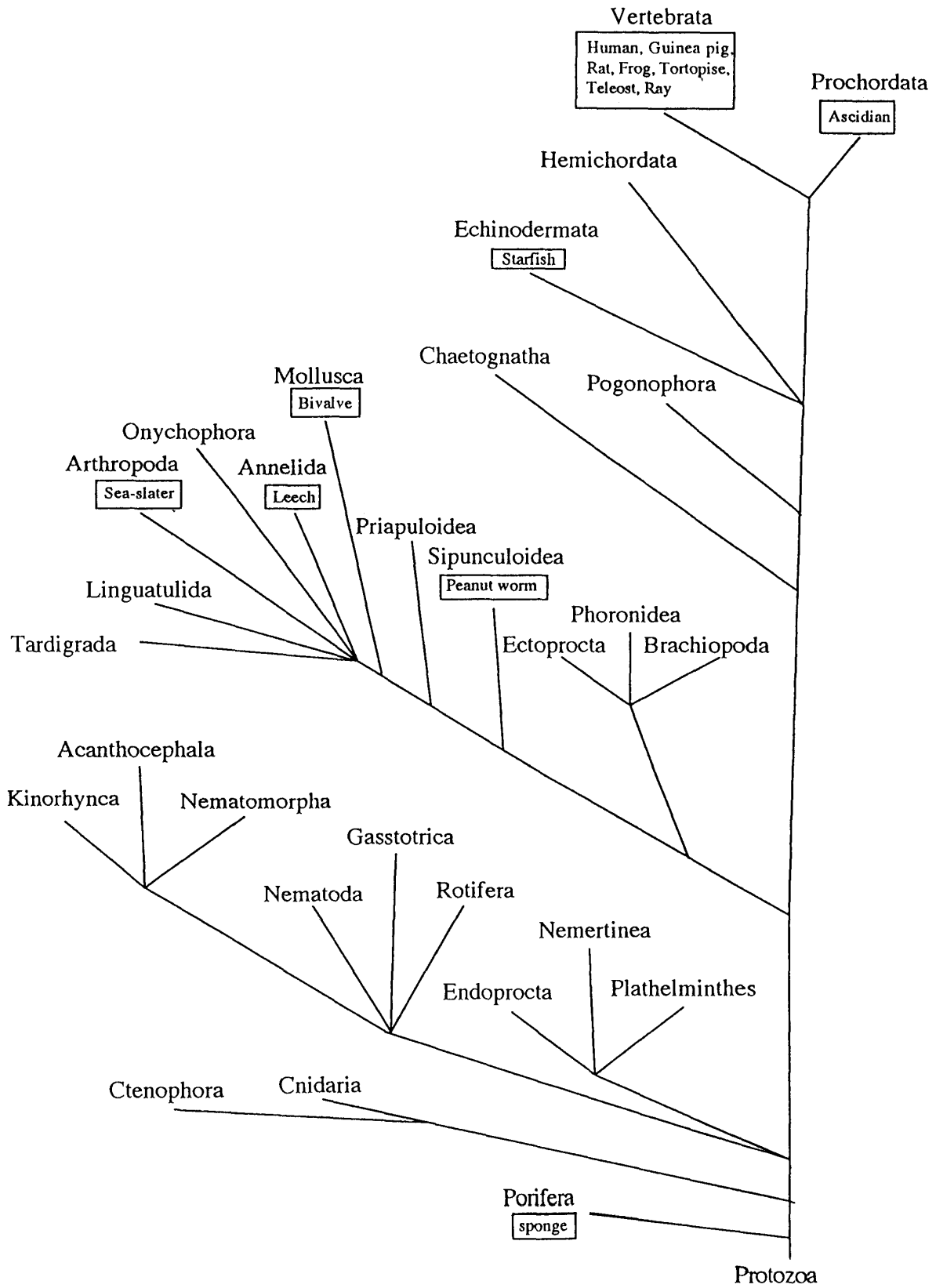


Fig.1. Scheme of genealogical tree

tion)を試料とした。これらの試料はLowry法¹⁵⁾によりタンパク濃度を定量し、5 mg/mlになるように上記の緩衝液で調製した後、SDS溶液（2.5% SDS, 50%グリセロール, 0.36 M 2-Mercaptoethanol, 25 mM Tris-HCl pH 6.8）を等量加え、100°C, 3分間熱処理した。

抗組換え39K抗体の作成：抗組換え39K抗体は、以下のように作成した。すなわち、200 µgの組換え39K¹⁶⁾と等量の完全フロイトアジュバントとでエマルジョンを作成し、ウサギの皮下へ接種した。二週間後、同量の組換え39Kと今度は不完全フロイトアジュバントとでエマルジョンを作成し、皮下へ接種した。この後、ブースターとして同様のエマルジョンを等間隔で2-3回接種した後、血清を採取した。この血清から硫酸塩析によりγ-グロブリンを精製し、それを抗組換え39K抗体として実験に供した。

電気泳動とウェスタンブロット：電気泳動は、Laemmliの方法¹⁷⁾に従い12% SDS-PAGEを行った。また、二次元電気泳動は、O'Farrellの方法¹⁸⁾に従い、一次元目は、LKB社のアンホラインを用いてpH 3.5-pH 9.0までの等電点電気泳動を行い、二次元目にLaemmliの方法¹⁷⁾による12% SDS-PAGEを行った。またウェスタンブロットは、Towbinの方法¹⁹⁾に従い、転写する膜は、ミリポア社のイモビロンを用いた。抗体と反応するタンパク質の検出は、以下のように行った。すなわち、転写膜を1%スキムミルクを含むTBS(25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)でブロッキングした後、一次抗体として1/1000希釈した抗組換え39K抗体で、室温で一時間incubationした。0.05% Tween-20を含むTBSで膜をよく洗浄した後、二次抗体として1/500希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体で、室温で一時間incubationした。0.05% Tween-20を含むTBSで膜をよく洗浄した後、3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorideを基質として発色させ、抗体と反応するタンパク質を検出した。

結果と考察

1. **抗組換え39K抗体の特異性：**使用した抗体の特異性を検討するため、モルモット好中球の細胞質タンパク質を二次元電気泳動した後、ウェスタンブロットを行った。その結果Fig. 2に示す如く、この抗体は種々のタンパク質を含むモルモット好中球の39Kのみを強く認識することが明らかとなった。特に好中球にはアネキシンが少なくとも6種類含まれていることが報告されており²⁰⁾、その共通したタンパク質構造からこの抗体が種々のアネキシンタンパク質と交差反応する可能性が考えられたが、この結果より、この抗体が39K すなわちアネキシンIのみを特異的に認識することが示唆された。

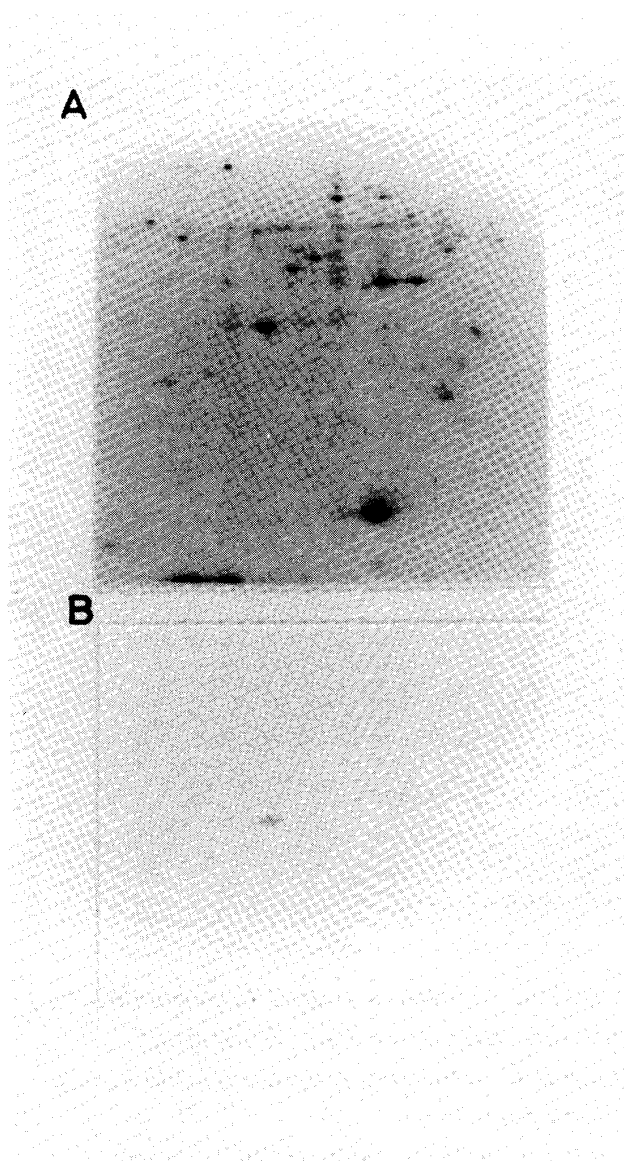


Fig.2. Two-dimensional electrophoresis of supernatant fraction obtain from guinea pig PMNs homogenate and distribution of 39K detected by western blotting using anti-recombinant 39K protein antibody.

Supernatant fraction of guinea pig PMNs homogenate was electrophoresed in two-dimensional electrophoresis and transferred to PVDF filter (immobilon).

A: Coomassie blue staining, B: Western blotting with anti-recombinant 39K antibody.

2. モルモット各組織における39Kの分布：モルモット各種組織の分布を検討すると Fig. 3 に示される如く、脳以外の組織にその存在が認められる。特に好中球が多く存在すると考えられる肺、脾臓や、従来からアネキシン I の存在が認められている上皮細胞系の胃、膀胱、皮膚、そして内皮細胞の豊富な胎盤に多く存在することが示された。

我々は、これまでに哺乳動物の好中球、ヒト、モルモット、ラットにおいて分子量の違いは僅かにあるが、種をこえて39Kが存在していることを報告した⁹⁾。また、データに示していないが、ラットについても39Kは、モルモットに見られた場合と同様な組織分布を示すことから、哺乳類で種をこえて39Kが存在する可能性が期待される。さらに、各組織のパラフィン切片を

抗組換え39K抗体で39Kの分布を検討すると、ウェスタンブロットで陽性である組織において好中球が強く反応しており、39Kが組織中でも好中球にかなり特異的に分布していることが示されている（データは示していない）。

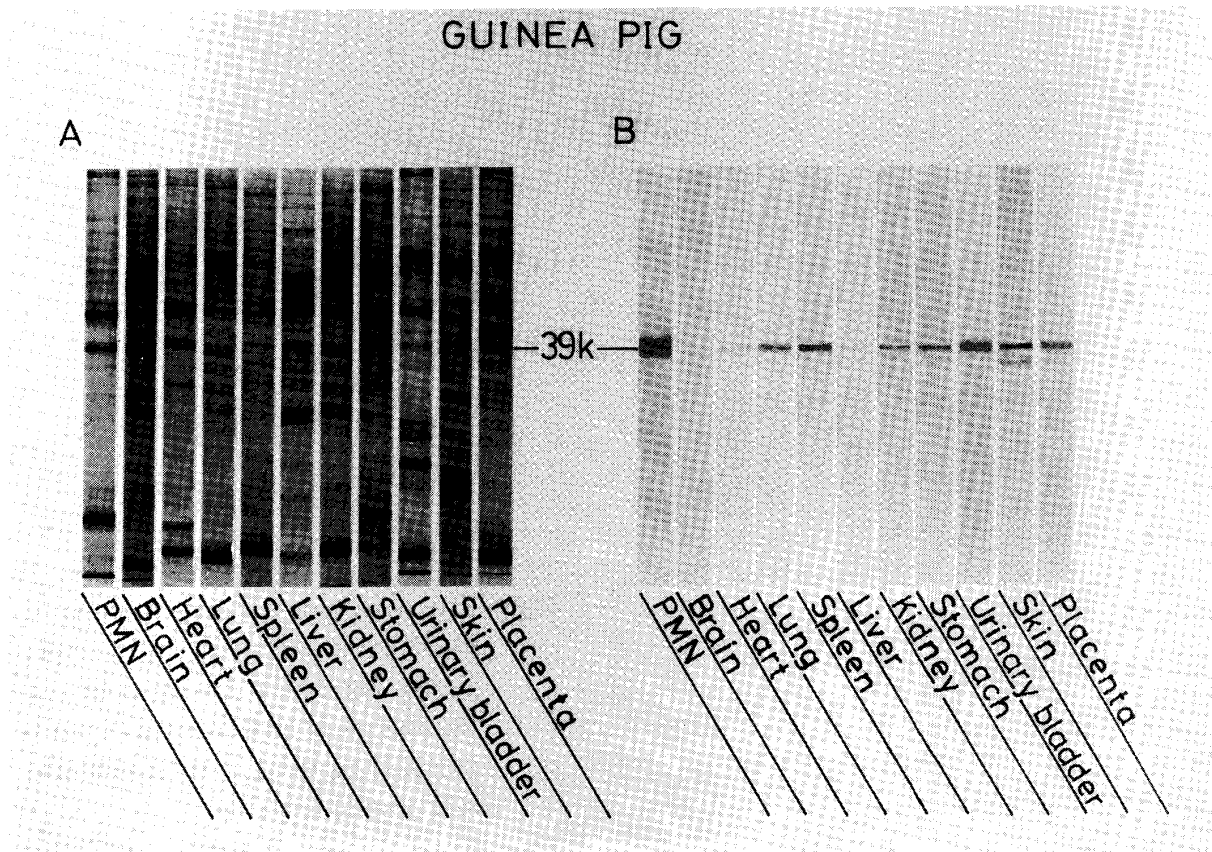


Fig.3. Distrubution of 39K in supernatant fractions of various organs homogenates in guinea pig detected by western blotting using anti-recombinant 39K antibody.

Supernatant fractions of whole tissue homogenates of guinea pig were electrophoresed in 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF filter (immobilon).

A : Coomassie blue staining, B : Western blotting with anti-recombinant 39K antibody

Lanes : PMN, 好中球 ; Brain, 脳 ; Heart, 心臓 ; Lung, 肺 ; Spleen, 脾臓 ; Liver, 肝臓 ; Kidney, 腎臓 ; Stomach, 胃 ; Urinary bladder, 膀胱 ; Skin, 皮膚 ; Placenta, 胎盤

3. 両生類及び爬虫類における39Kの分布：そこで、両生類（ここではウシガエル）の各組織について39Kの分布を検討した。Fig. 4にその結果を示す。ウシガエルでは、哺乳類ほどの強い反応性は認められないが、肺、膀胱に多く存在することが認められた。また、胃、皮膚、脾臓にも39Kの存在が認められ、心臓、腎臓にもその反応性は弱いながらも明らかに39Kの存在が認められた。この結果より、39Kはウシガエルにおいてもモルモットと同様の分布を示すことが明らかになった。ここではデータを示していないが、爬虫類であるクサガメについてもウシガエルと同様な強さの反応性と分布を示すことが明らかとなった。

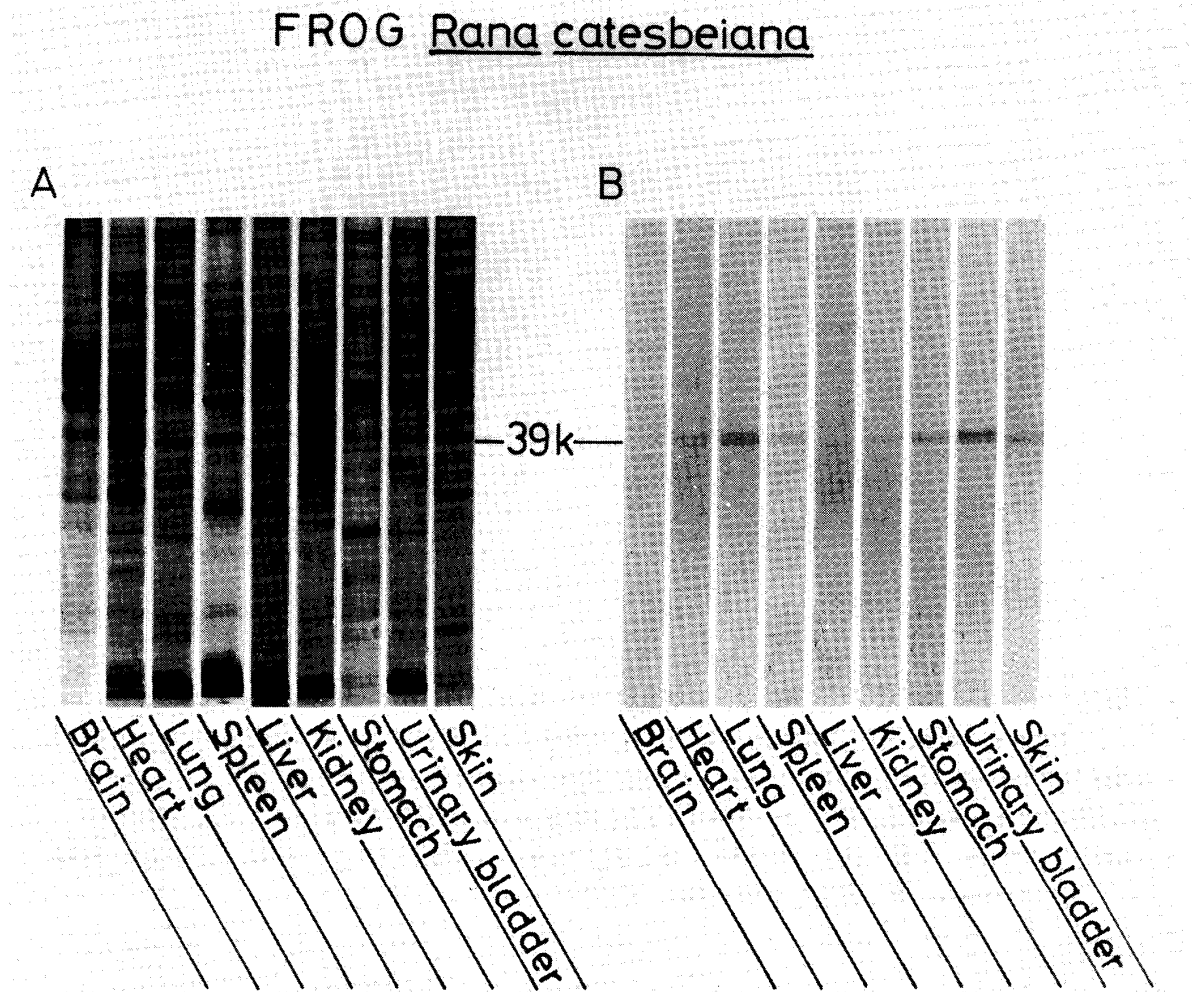


Fig.4. Distribution of 39K in supernatant fractions of various organs homogenates in frog detected by western blotting using anti-recombinant 39K protein antibody.

Experiment conditions were in Fig.3 except that animal is frog.

A : Coomassie blue staining, B : Western blotting with anti-recombinant 39K antibody

Lanes : Brain, 脳 ; Heart, 心臓 ; Lung, 肺 ; Spleen, 脾臓 ; Liver, 肝臓 ; Kidney, 腎臓 ; Stomach, 胃 ; Urinary bladder, 膀胱 ; Skin, 皮膚

4. 魚類における39Kの分布：次に、魚類ここでは硬骨魚類のイシダイと軟骨魚類のアカエイについてその分布を検討した。その結果、Fig. 5, Fig. 6 に示す如く、両生類よりもかなり弱い反応性が、イシダイについては心臓、浮き袋、胃、皮膚、エラに、アカエイについては胃、皮膚に認められた。

5. その他の種における39Kの分布：先にも述べたようにアネキシン様タンパク質の内、アネキシンIX, Xはショウジョウバエに、アネキシンVIIは粘菌などかなり下等な動物や植物にまで存在することが明らかになっている。そこで、さらに系統分類上遠縁の動物についても39Kの存在の検討を試みた。Fig. 7はその結果を示す。すなわち、試料として用いたダイダイイソカイメン、フナムシ、ウマビル、ヌノメイトマキ、サメハダホシムシ、アサリ、シロボヤのいずれ

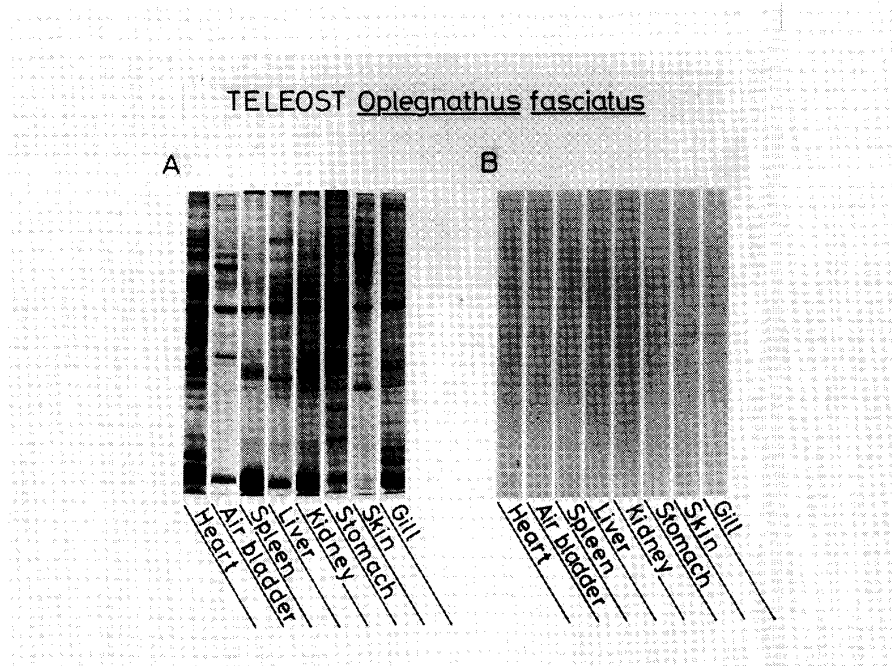


Fig.5. Distribution of 39K in supernatant fractions of various organs homogenates in teleost detected by western blotting using anti-recombinant 39K protein antibody.

Experiment conditions were in Fig.3 except that animal is teleost.

A : Coomassie blue staining, B : Western blotting with anti-recombinant 39K antibody

Lanes: Heart, 心臓; Air bladder, 浮き袋; Spleen, 脾臓; Liver, 肝臓; Kidney, 腎臓; Stomach, 胃; Skin, 皮膚; Gill, えら

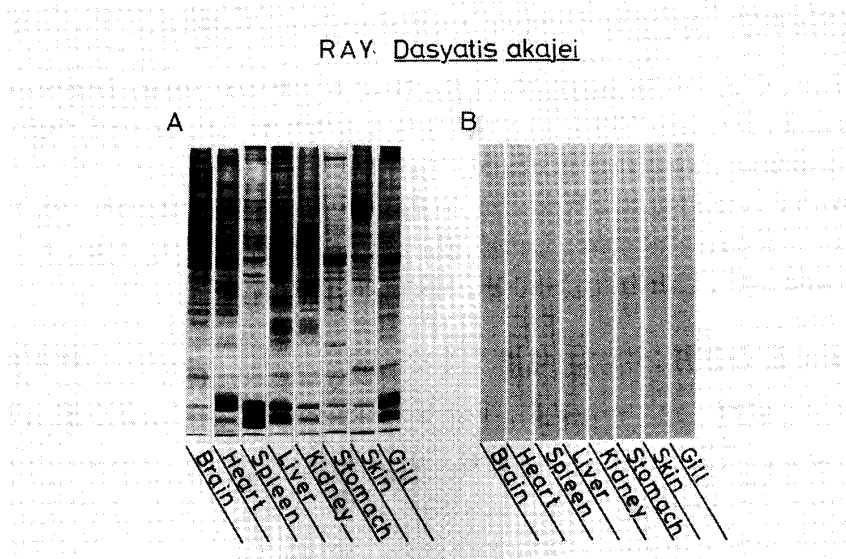


Fig.6. Distribution of 39K in supernatant fractions of various organs homogenates in ray detected by western blotting using anti-recombinant 39K protein antibody.

Experiment conditions were in Fig.3 except that animal is ray.

A : Coomassie blue staining, B : Western blotting with anti-recombinant 39K antibody

Lanes: Brain, 脳; Heart, 心臓; Lung, 肺; Spleen, 脾臓; Liver, 肝臓; Kidney, 腎臓; Stomach, 胃; Skin, 皮膚; Gill, えら

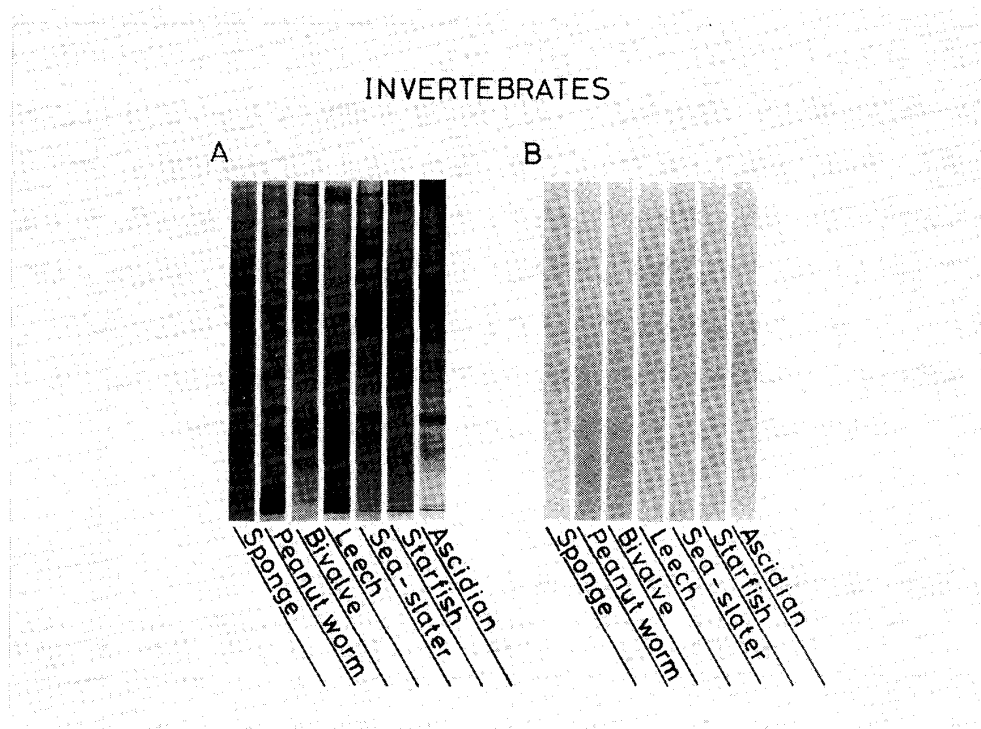


Fig.7. Distribution of 39K in supernatant fractions of various invertebrates homogenates detected by western blotting using anti-recombinant 39K antibody.

Experiment conditions were in Fig.3 except that animal is invertebrates.

A: Coomassie blue staining, B: Western blotting with anti-recombinant 39K antibody

Lanes: Sponge, クロイツカイメン; Peanut worm, サメハダホシムシ; Bivalve, アサリ; Leech, ウマビル; Sea-slug, フナムシ; Starfish, ヌノメイトマキ; Ascidian, シロボヤ

においても39Kの存在は認められなかった。なおデータに示していないが、この他に大腸菌、酵母においても39Kの存在は認められなかった。これらの試料は、各臓器ごとに分けて調製していないので、かなり多くのタンパク質が含まれているため39Kが検出できないのかもしれない。すなわち、この試料をCa⁺⁺依存性にリン脂質に結合するタンパク質まで部分精製し、ウエスタンブロットを行えば検出できる可能性が考えられる。また、アネキシンIと共通な抗原性を持たないアネキシントタンパク質が存在している可能性も考えられる。しかし、本実験で行った方法では、抗組換え39K抗体の検出できる範囲は、脊椎動物の範囲内に止まった。これに関連して、アネキシンIのcDNAが報告されているのは、哺乳類のヒト²¹⁾、マウス²²⁾、ラット²³⁾、モルモット¹⁾そして鳥類のハト²⁴⁾であり、さらに最近、かなり系統分類上上流の位置にあるカイメンにおいてアネキシンIと相同性の高いcDNAが報告されており¹¹⁾、さらに検討する必要がある。

結 論

これらの結果をまとめると Table 1. のとおりとなる。すなわち、モルモット好中球の細胞質に含まれる Ca^{++} 依存性酸性リン脂質結合タンパク質である39K (アネキシン I) の cDNA を発現ベクターに挿入し酵母に組換え39K を生成させ、それに対する抗体を作成し、ウエスタンブロット法により系統的に39K の存在を検討した。その結果、哺乳類、爬虫類、両生類、魚類には39K の存在は認められ、その組織分布も類似しているが、それ以下の動物には39K の存在は認められなかった。また39K は上皮細胞系、あるいは内皮細胞の多い組織に存在することが示されたが、組織標本の免疫抗体法による染色の結果、それらの組織では好中球が多く認められることより、その組織の陽性反応は好中球に分布する39K の可能性が高い。

Table 1. Phylogenic distribution of 39k protein in various animals.

	Total PMN	脳	心	肺	脾	肝	腎	胃	膀胱	皮	浮袋	えら	
<i>Cavia porcellus</i> (モルモット)	◎	◎	×	○	◎	◎	△	△	○	◎	◎	—	—
<i>Homo sapiens</i> (ヒト)	◎	◎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rattus norvegicus</i> (ラット)	◎	◎	×	△	◎	◎	×	×	—	—	—	—	—
<i>Geoclemys reevesii</i> (クサガメ)	○	—	—	—	—	◎	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rana catesbeiana</i> (ウシガエル)	○	—	○	○	◎	○	△	△	◎	◎	◎	○	—
<i>Oplgnathus fasciatus</i> (イシダイ)	△	—	—	△	—	—	—	—	△	—	△	△	△
<i>Dasytis akajei</i> (アカエイ)	△	—	×	—	×	×	×	×	—	△	—	—	—
<i>Styela plicata</i> (シロボヤ)	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (コウボ)	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> (ダイチヨウキン)	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Negative species ;

Asterina batheri (ヌノメイトマキ), *Ligia exotica* (フナムシ), *Whitmania pigra* (ウマビル), *Phascolosoma scolops* (サメハダホシムシ), *Tapes philippinarum* (アサリ), *Halichondria japonica* (ダイダイイソカイメン)

◎, ++ ; ○, + ; △, ± ; ×, - ; —, n.d.

文 献

- 1) Sato, E.F., Tanaka, Y., and Utsumi, K., cDNA cloning and nucleotide sequence of lipocortin-like 33 kDa protein from guinea pig neutrophils. *FEBS Lett.*, **244**, 108-112 (1989)
- 2) Utsumi, K., and Sato, E.F., Stimulus Response Coupling (Smith, V.L., and Dedman, J.R., ed), p. 410-442, CRC Press, Florida (1990)
- 3) Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Sasaki, J., Inoue, M., and Utsumi, K., Novel Calcium-Binding Proteins (Heizmann, C.W., ed), p. 567-588, Springer-Verlag, Berlin (1991)
- 4) Klee, C.B., Ca⁺⁺-dependent phospholipid-(and membrane-) binding proteins. *Biochemistry*, **27**, 6645-6653 (1988)
- 5) Moss, S.E., Edwards, H.C., and Crumpton, M.J., Novel Calcium-Binding Proteins (Heizmann, C.W., ed) p. 535-566, Springer-Verlag, Berlin (1991)
- 6) Flower, R.J., Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 987-1015 (1988)
- 7) Drust, D.S., and Creutz, C.E., Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature*, **331**, 88-91 (1988)
- 8) Pollard, H.B., Burns, A.L., and Rojas, E., Synexin (Annexin VII): A cytosolic calcium-binding protein which promotes membrane fusion and forms calcium channels in artificial bilayer and natural membrane. *J. Membrane Biol.*, **117**, 101-112 (1990)
- 9) Crumpton, M.J., and Dedman, J.R., Protein terminology tangle. *Nature*, **345**, 212 (1990)
- 10) Jhonston, P.A., Perin, M.S., Reynolds, G.A., Wasserman, S.A. and Sudhof, T.C., Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. Cloning, characterization and differential expression in development. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11382-11388, (1990)
- 11) Robitzki, A., Schroder, M.S., Ugarkovic, D., Gramzow, M., Fretsche, U., Batel, R., and Muller, W.E.G., cDNA structure and expression of calpactin, a peptide involved in Ca²⁺-dependent cell aggregation in sponges. *Biochem. J.*, **271**, 415-420 (1990)
- 12) Smallwood, M., Keen, J.N., and Bowles, D.J., Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochem. J.*, **270**, 157-161 (1990)
- 13) Greenwood, M., and Tsang, A., Sequence and expression of annexin VII of dictyostelium discoideum. *Biochem. Biophys. Acta*, **1088**, 429-432 (1991)
- 14) Sato, E.F., Morimoto, Y.M., Matsuno, T., Miyahara, M., and Utsumi, K., Neutrophil specific 33 kDa protein: its Ca²⁺-and phospholipid-dependent intracellular translocation. *FEBS Lett.*, **214**, 181-186 (1987)
- 15) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 16) Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y.M., Inoue, M., and Utsumi, K., Expression of the cDNA encoding lipocortin-like 39 kDa protein of guinea pig neutrophils in yeast. *FEBS Lett.*, **255**, 231-236, (1989)
- 17) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 18) O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975)
- 19) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, **76**, 4350-4354 (1979)

- 20) Comera, C., Rothhut, B., Cavadore, J., Vilgrain, I., Cochet, C., Chambaz, E., and Russo-Marie, F., Further characterization of four lipocortins from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Cell Biochem.*, **40**, 361-370 (1989)
- 21) Wallner, B.P., Mattaliano, R.J., Hession, C., Cate, R.L., Tizard, R., Sinclair, L.K., Foeller, C., Chow, E.P., Browninig, J.L., Ramachandran, K.L., and Pepinsky, R.B., Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A₂ inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*, **320**, 77-81 (1986)
- 22) Sakata, T., Iwagami, Y., Tsurauta, R., Suzuki, K., Hojo, K., Sato, K., and Teraoka, H., Mouse lipocortin I cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11819, (1988)
- 23) Tamaki, M., Nakamura, E., Nishikubo, C., Sakata, T., Shin, M., and Teraoka, H., Rat lipocortin I cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 7637 (1987)
- 24) Horseman, N.D., A prolactin-inducible gene product which is a member of the Calpactin/Lipocortin family. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 773-779 (1989)

(1991年9月7日受理)