



Title	D-アミノ酸酸化酵素の酵素免疫測定法の開発と免疫化学的研究
Author(s)	片桐, 昌直
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35251
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	かた 片	ぎり 桐	まさ 昌	なお 直
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7203	号	
学位授与の日付	昭和61年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻			
学位論文題目	学位規則第5条第1項該当 D-アミノ酸酸化酵素の酵素免疫測定法の開発と免疫化学的研究			
論文審査委員	(主査) 教授 田川 邦夫			
	(副査) 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博			

論文内容の要旨

（目 的）

D-アミノ酸酸化酵素（DAO）活性は、哺乳動物の種々の臓器のペルオキシゾームに広く分布することが報告されている。しかしDAOに特異的な高感度のassay法がなかったため、DAOの臓器間の正確な分布や各動物種の各臓器DAOの酵素化学的およびタンパク化学的諸性質については不明の点がいまだ多い。そこで、本研究では抗ブタ腎臓DAO抗体を調製し、この抗体を用いてDAOの高感度定量法として酵素免疫測定法を開発しDAOの臓器間分布について検討すること、およびブタおよび他の動物種の種々の臓器のDAOの免疫化学的比較研究を行うことを目的とする。

（方法ならびに成績）

1）ブタ腎臓よりDAOを電気泳動的に単一になるまで精製し、これをウサギに免疫することにより抗DAO血清を得た。血清よりゲルろ過法によりIgG分画を調製した。さらにIgGをペプシン処理後還元することによりFab'断片を得た。抗DAO-Fab'断片と西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）とをマレイミド誘導体により架橋し酵素標識抗DAO-Fab'を調製した。Fab'/HRPモル比が約1の標品を以下の実験に用いた。

2）抗DAO・IgGをポリスチレンビーズに吸着させたものを固相とし、上記酵素標識抗DAO抗体を第二抗体としたサンドイッチ法による酵素免疫測定法（EIA）を確立した。本測定法により全測定時間24時間で臓器粗抽出液中のDAO含量を1 - 100 ng/mlの高感度で正確に定量できるようになった。

3）EIAを用い当教室においてDAOから分離されたQuasi-DAOとDAOとの比較定量を行ったところ、両者は同一の反応性を示した。

4) EIAを用いて測定したブタの各臓器中の酵素含量は腎臓皮質では $140 \mu\text{g/g}$ 組織, 肝臓では $50 \mu\text{g/g}$ 肺臓では 20ng/g , 小脳では $7 \mu\text{g/g}$ であった。また, 大脳および心臓では 2ng/g 組織以下であった。上記各臓器の酵素活性を測定しEIAで定量した酵素含量とから比活性を推定したところ腎臓, 肝臓, 小脳ではそれぞれ17, 16, 21mol/min/mg タンパク質と実験誤差内で一致した値を示し, 臓器間でDAOの比活性に差異がないことが判明した。

5) ブタ, イヌ, ラットの各腎臓粗抽出液の $10,000 \text{g}$ 遠心上清中のDAO含量をEIAにより比較したところ, イヌとラットではDAO活性をもつにもかかわらずEIAの反応性が弱く特にラットDAOは本EIAでは測定不能であった。抗ブタDAO抗体のイヌ, ラットDAO活性に対する中和活性は, ブタDAOに対するものに比べ $1/2 \sim 1/3$ 程度であるので, このことはイヌ, ラットDAOともにブタDAOと共通抗原性を有するものの, その抗体に対する親和性が著しく低下していることによるものと思われる。

6) ブタの各臓器粗抽出液 $10,000 \text{g}$ 遠心上清をSDS-PAGEによって展開後ニトロセルロース上にブロットし抗DAO抗体を膜上で抗原と反応させ, 次にHRP標識-抗ウサギIgG抗体と反応させた後, HRPの沈着性基質によりDAOのバンドを同定した(ウエスタンブロッティング)。その結果, 腎臓においてはDAOとQuasi DAOのバンドが, また肝臓, 小脳標品では腎臓DAOと同一の位置にバンドが出現した。また同様にラット, イヌの腎臓標品についてもウエスタンブロッティングを行ったところ, イヌDAOはブタDAO(分子量 $40,000$) より分子量が約 800 大きく分子量 $40,800$ と推定された。ラットDAOは分子量 $40,300$ と $38,800$ の位置に2本のバンドが現われブタのQuasi DAOに相当するものがラット腎臓にも存在することが明らかとなった。

(総括)

1) マレイミド法により調製した酵素標識抗ブタDAO抗体を用いたサンドイッチ法による酵素免疫測定法(EIA)を確立しDAO含量 1ng/ml を測定することが可能となった。

2) EIAを用いブタ各臓器のDAO, Quasi DAO含量を測定した。また, 酵素活性と含量から推定された比活性は腎臓, 肝臓, 小脳DAOで一致した。

3) ブタ, イヌ, ラット腎臓DAOと本EIA系との反応性は異なり特にラットはほとんど反応性を示さなかった。

4) ウエスタンブロッティングによりブタ各臓器DAOの分子量を推定したところすべて同一であり, 上記結果と合わせ本酵素の臓器間差異は極めて小さいものと思われる。一方, イヌ, ラットの腎臓DAOの分子量はブタDAOとよく似ているものの微妙に異なっており種間差異が明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

D-アミノ酸酸化酵素はKrebsによりブタの腎臓および肝臓に活性が見出されて以来, 研究が行われているが今だその生理的意義は不明であり, 新しい展開が必要とされていた。本論文の著者は, 本酵素の微量定量法として酵素免疫測定法を確立し, ブタ各臓器におけるD-アミノ酸酸化酵素の分布を明ら

かとした。さらに酵素化学的、および免疫化学的手法を用いて、ブタの腎臓、肝臓、および小脳に存在するD-アミノ酸酸化酵素が、諸性質において同一である事を明らかなとした。以上の結果は、本酵素の研究上重要な知見であると考えられる。さらに、本酵素が腎臓尿細管に局在する事を考え合わせると、この測定系を腎病態研究へ応用する可能性も示唆され、今後この方面への発展も期待出来るものである。したがって、本論文は充分学位に値するものと評価する。