



Title	ドーパ脱炭酸酵素及びヒスチジン脱炭酸酵素の比較免疫学的研究
Author(s)	山本, まや
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35305
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)	山本 まや
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7652 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ドーパ脱炭酸酵素及びヒスチジン脱炭酸酵素の比較免疫学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博 (副査) 教授 吉田 博 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

〔目 的〕

ドーパ脱炭酸酵素 (DDC, EC4.1.1.28) は、カテコラミン及びセロトニンの合成に関与する酵素で、末梢組織に広く分布する一方、脳においてはある種のニューロン群に局在することが知られている。しかし、ラット脳におけるその免疫組織化学的研究は、ラット以外他種の動物の DDC に対する抗体を用いて行なわれてきた。そこで我々はラット肝より DDC を精製し、それに対する特異的なポリクロナル及びモノクロナル抗体を作製、その諸性質を検討した。さらにそのなかで、我々の教室でこれまで研究を続けてきたヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC, EC4.1.1.22) との免疫学的交叉性に対する知見が得られたので、両者に対する抗体を用いて免疫化学及び免疫組織化学的に検討した。

〔方法と成績〕

- 1) DDC の精製とその性質：ラット肝粗抽出液を熱処理 (50°C, 5 分) し 50% 硫酸沈澱後 DEAE-セルロース、フェニルセファロース、ヒドキシシアパタイト、セファデックス G-100 の各カラムクロマトグラフィーを用いて、回収率 4.2%、約 800 倍に精製した。最終標品は、比活性 5.9 U/mg 蛋白 (1 U = 1 μ mol ドパミン産生/min) で SDS-PAGE 上単一のバンドを示した。ゲル濾過の結果と合わせ、分子量 50,000 のサブユニットから成るホモダイマーであった。L-ドーパに対する K_m は 0.16 mM で反応の至適 pH は 6.9、等電点は pH 5.7 であった。可視部領域の吸光スペクトルでは、330 と 420 nm の位置に極大吸収を示した。PLP の添加は吸収に影響を与えなかった。
- 2) ポリクロナル抗 DDC 抗体の作製：精製 DDC 100 μ g をフロイント完全アジュバントと家兎の皮下に免疫し、1 ヶ月毎に 3 回同量をフロイント不完全アジュバントと共に追加免疫した。最終免疫の

2週間後採血し抗血清を得た。この抗血清は、ラット、モルモット及びウサギのDDC (2 nmol/min)を免疫沈降するのに各1, 10, $100\text{ }\mu\text{l}$ 必要とした。HDC活性には影響を与えなかった。

- 3) モノクロナル抗DDC抗体の作製: 2)と同様にBALB/cマウスに免疫し、最終免疫の3日後脾細胞を調整し、マウスミエローマ細胞(SP2)とPEG1500による細胞融合を行なった。培養上清の抗DDC抗体活性は、精製DDCを抗原とし2次抗体にペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを用いたELISA法により検出した。8種のモノクロナル抗体が得られた。その一つMA-1抗体はIgG₁サブクラスに属し、ラットとモルモットのDDC活性(2 nmol/min)を免疫沈降するのに抗体 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ を必要とした。ウサギのDDCには反応しなかった。イムノブロッティングを行なうとラット肝ホモジネート中、分子量50,000のDDC分子のみを認識した。
- 4) 抗体の特異性の免疫沈降による検討: 抗DDC抗体は、ラット及びモルモットのDDCを免疫沈降したが、HDCには反応しなかった。逆に抗HDC抗体はHDCを免疫沈降したが、DDCには反応しなかった。
- 5) ラット脳における免疫組織化学: 今回得られた抗DDC抗体と既に得られている抗HDC抗体を用いて、ラット脳における抗DDC及びHDC陽性細胞の分布を間接免疫組織蛍光法により検討した。ラット脳において、抗DDC抗体は従来カテコラミン/セロトニンニューロンとして知られる細胞群を陽性に示した。一方抗HDC抗体は、視床下部後部に存在するニューロンのみを検出した。
- 6) モルモット脳における免疫組織化学: 同様に両抗体を用い、モルモット脳の間接免疫組織蛍光法を行なったところ、抗DDC陽性細胞を抗HDC抗体が認識することが連続切片法によりわかった。このことから二つの可能性が考えられる。一つは同じ細胞がDDCとHDCを両方持っているか、又は、同じDDC分子を抗HDC抗体が交叉認識したのかである。後者を証明するために以下の実験を行なった。
- 7) モルモットDDCの抗体カラムによる精製: 抗体カラムは、あらかじめ抗マウスIgGを結合させたプロテインA-セファロースにモノクロナル抗DDC抗体(MA-1)を反応させ架橋したものをを用いた。DEAE-セルロースで部分精製したモルモット肝DDCを、抗体カラムにかけ酸溶出し精製した。
- 8) イムノブロッティング: 7)で得られた精製モルモットDDCを、ラットDDC、ラットHDCと共にSDS-PAGE後ニトロセルロース膜にブロットし、抗HDC及び抗DDC抗体で検出すると、抗HDC抗体はラットHDCのみならずモルモットDDCをも認識することがわかった。

[総括]

- 1) ラット肝よりDDCを精製し、その諸性質を調べた。
- 2) 精製DDCを抗原とし、ポリクロナル及びモノクロナル抗DDC抗体を作製しその性質を検討した。
- 3) 抗HDC抗体は、未変性のモルモットDDCに対しては反応しないが変性したDDCを認識した。即ち、分子内部においてDDCとHDCに共通構造があり、脱炭酸酸素としての機能との関連を示唆するデータが得られた。

論文の審査結果の要旨

ドーパ脱炭酸酵素は中枢神経系や末梢の各臓器に幅広く分布しカテコラミンやセロトニンの生合成に関与する重要な酵素である。本論文は、この酵素をラットの肝より初めて純化精製しその諸性質を調べると共に、ポリクロナル及びモノクロナル抗体は上記神経線維の免疫組織化学的な良い指標となることを明らかにした。さらにヒスタミンを合成するヒスチジン脱炭酸酵素との間にラットにおいては全く免疫学的交叉性を認めなかったのに対し、ラットとモルモットの両酵素間には一部免疫学的な交叉性が存在し、ラット抗ヒスチジン脱炭酸酵素抗体がモルモットのドーパ脱炭酸酵素をも検出することを証明した。即ち、ある抗体を異種の動物に対して適用する際には異種の抗原に対してもその交叉性を厳密に検討しなければならないことを明らかにした。

本研究は、脱炭酸酵素の性質、免疫学的交叉性解明の点で価値ある業績であり、学位論文に値するものである。