

Title	A Monoclonal Antibody against COOH-terminal Peptide of Human Liver Manganese Superoxide Dismutase
Author(s)	川口, 哲男
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38331
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川口哲男
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10339 号
学位授与年月日	平成 4 年 6 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	A Monoclonal Antibody against COOH-terminal Peptide of Human Liver Manganese Superoxide Dismutase (ヒトマンガン・スーパーオキシド・ディスムターゼの C 末端ペプチドに反応するモノクローナル抗体)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

[目的]

Superoxide Dismutase (SOD) は生体で産生される活性酸素 (O_2^-) を H_2O_2 と O_2 に不均化することによって細胞を保護している金属酵素である。哺乳類の組織中には Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, extra cellular SOD の 3 種のアイソザイムが存在し、それぞれ別の染色体上の遺伝子によりコードされている。Cu, Zn-SOD と extra cellular SOD はそれぞれサイトゾル中と細胞外に存在するのに対し、Mn-SOD は主にミトコンドリアのマトリックスに存在すると報告されている。

癌化や老化した組織の SOD 活性は、正常組織や幼若組織と比較して低いことが多く報告されてきたが、ポリクローナル抗体を用いた ELISA により組織中の SOD の蛋白量を測定すると、肺癌組織中では不活性の Mn-SOD が増加していることなども報告されている。従って、Mn-SOD を免疫化学的に測定することによって、組織の病理学的変化についての有用な情報が得られると考え、ヒト Mn-SOD に対するモノクローナル抗体を作製した。

[方法ならびに成績]

精製した Mn-SOD をマウス (BALB/c, ♀, 8 週令) 腹部皮下に、20ug ずつ 2 週間おきにアジュバントを用いて免疫した。融合の 4 日前に尾静脈に最終免疫し、常法に従って細胞融合を行った。スクリーニングは抗ヒト Mn-SOD ヤギ抗体を固相化し、Mn-SOD を反応させたイムプレートをを用いた ELISA により行った。クローニングは限界希釈法で行った。

得られた抗体の反応性を確認するために免疫沈降を行った。培養上清と Mn-SOD を反応させた後、protein A-agarose を加えて遠心分離した上清中の Mn-SOD 活性を測定した。拾ってきた抗体産生ハイブリドーマのうち 3 株が Mn-SOD と反応し、そのサブクラスは 2 株が IgM で、1 株が IgG2a (PG11) であった。

更に、抗体の特異性を確認するためにイムノプロットを行った。3 株の抗体とも Mn-SOD と特異的に反応した。

生検で得た肝組織を PD11 で免疫組織染色を行ったところミトコンドリアのみが染色され、サイトゾルは染色されなかった。

さらに Mn-SOD の N 末と C 末の部分ペプチドを合成し、競合反応 ELISA により検討したところ、PG11 のエピトープは C 末端にあることが判明した。

[総括]

ヒト Mn-SOD に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ3株を得、その内の1株である PG11 を用いて免疫化学的検討を行った。抗体は特異的に Mn-SOD と反応することがイムノプロットによって確認された。免疫組織化学的検討により Mn-SOD はミトコンドリア中に存在することが示された。さらに Mn-SOD の部分ペプチドを合成して抗体との反応性を検討したところ、C 末のアミノ酸と反応した。

ヒト Mn-SOD に対するモノクローナル抗体に関して、そのエピトープおよび Mn-SOD の免疫細胞化学的分布を示した最初の報告である。

論文審査の結果の要旨

本論文は、活性酸素の1種・スーパーオキシドアニオンのスカベンジャーである、ヒトマンガン・スーパーオキシド・ディスムターズ (Mn-SOD) に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立し、免疫学的手法による Mn-SOD の検出について検討したものである。

この結果、Mn-SOD のカルボキシル末端部分をエピトープとする抗体産生株を含む Mn-SOD に特異的な3株のハイブリドーマが得られ、この抗体を用いたイムノプロットや組織染色による検出が可能となった。組織染色の結果、Mn-SOD がミトコンドリア・マトリクスに局在することが確認された。

本研究により得られたモノクローナル抗体は、酵素免疫測定法による Mn-SOD の測定に応用可能であり、Mn-SOD と病態との関連の解明に有用で、学位に値すると思われる。