

氏名	篠原利道 しのはらとしみち
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第494号
学位授与の日付	昭和50年5月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	A Radioimmunoassay for The Detection of Delta Crystallin in Chick Lens Differentiation

(鶏胚水晶体デルタークリスタリンの放射性免疫反応に対する同定)

論文調査委員 (主査) 教授 岡田節人 教授 丸山工作 教授 吉沢透

論文内容の要旨

δ -クリスタリンはニワトリ水晶体に特異的に存在するタンパク質であって、成形ニワトリの水晶体の含む総タンパク量のうちの、じつに70~80%がこのタンパク質によって占められている。

申請者の研究は、このような特異なタンパク質がニワトリの個体発生の中のどの時期から出現し、どのような経過で増加していくかの過程を、放射免疫化学の技術を駆使することによって、鋭敏かつ正確に量的に明らかにしようと試みたものである。

まず、ニワトリ13日胚の水晶体繊維の塩抽出物を、硫酸アンモニウム沈澱させてこれから純粋な δ -クリスタリンを分離した。これには電気泳動によって分離させるのが最も純粋な標本を得るのに適していることが示される。この標本をウサギに注射して、 δ -クリスタリンに対する抗体を準備する。得られた抗体の純度は、繰返し検定された。一方、 δ -クリスタリンの純粋な標本をクロラミン T 法を用いて I^{125} と結合させた。その結果、 δ -クリスタリンの抗原分子としての特異性に変化をもたらすことがあるか否かを、先に準備した δ -クリスタリンに対する抗体との反応によって検定し、 I^{125} との結合による変性の起こらないことを明らかにした。

このような抗 δ -クリスタリン抗体と、 I^{125} 結合抗原 (δ -クリスタリン) を用いて“タンパク結合競合法”によって、未知の標本中に含まれる δ -クリスタリンの最少検出可能量を明らかにした。この方法によって 50~1000 nanogram の範囲で δ -クリスタリンの定量が可能である。

以上のような基本的技術の確立を行ってから発生中のニワトリ胚について δ -クリスタリンの定量を行なった。孵卵24時間目以後の胚について適当な時間間隔をおいて定量してみると、まず孵卵48時間までは検出不可能であって、100個の水晶体に含まれる δ -クリスタリンの量は、存在していたとしても 10 ng 以下である。孵卵 54 時間になると始めて検出可能となり、100 個の水晶体当たり 80—220 ng が含まれる。以後の δ -クリスタリン量の増加は急激であって、66時間では100個の水晶体当たり 250—590 ng, 72時間では 450—750 ng であって、6日目では、じつに1個の水晶体当たりの δ -クリスタリン含有量は 3190—4400

ng に達する。6 日目では δ -クリスタリンは、水晶体の含む総タンパク質量の30~40%を占めている。

次に水晶体以外の組織に δ -クリスタリンが含まれているか否かを検定した。6 日目および13 日目の胚から、脳、網膜、肝臓、筋肉、腎臓などを取り、それぞれの抽出物を一定量の δ -クリスタリンと混ぜて、放射免疫化学による定量を行なうと、もとの入れた δ -クリスタリン量と一致した値が得られた。つまり、これらの水晶体以外の組織には、検出可能量以上の δ -クリスタリンは存在しないことが明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

δ -クリスタリンはニワトリの水晶体に限って存在する極めて特異的なタンパク質であって、その存在は、とりわけて免疫化学的方法で確実に検定できる。従って、このようなタンパク質がニワトリの個体発生に伴ってどのように出現してくるかを研究することは古くから多くの研究者の関心をもつところであって、すでにかかなりの報告がなされている。

しかし、このような研究において基本的に最も重要な点は、用いる技術が鋭敏に δ -クリスタリンのみを検定し得、しかも定量を可能にするものであることである。申請者はこれらの基本的な重要点をよく理解し、そのような技術の開発にまず力を注いだ。

申請者の用いた方法は、放射免疫化学法であって、極めて特異的な抗 δ -クリスタリン抗体と、 I^{125} で標識した純粋な δ -クリスタリン標本を得ることによって所期の目的を達成するのに成功している。主論文の前半部は、このような技術の基本的な検討にさかれているが、このことは申請者の得た結果の信頼性を証明するために必要不可欠である。

以上のような基本的な検討に立脚して発生中のニワトリ胚における δ -クリスタリンの定量を行なった。その結果は、孵卵48時間という時期がこのタンパク質の出現の最初であり、以後孵卵6 日目に至るまでに劇的ともいえる増加を示すことを明らかにした。申請者はこの研究と平行して δ -クリスタリンの情報をもつメッセンジャー RNA の出現期の検定を行ない、やはり孵卵48時間がその出現の初めになっていることを示すのに成功している。

以上の如く、申請者の研究は極めて信頼性の高い技術を駆使して発生中の胚のごく微量に存在するタンパク質の定量に成功したのであって、発生を分子レベルで研究するための重要な貢献を行なったものと考えられる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。