

氏名	井 階 幸 一 い かい こう いち
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 551 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Immunohistochemical Demonstration of Poly (ADP-ribose) in Nuclei of Various Rat Tissues (ラット諸組織の核におけるポリ (ADP-リボース) の免疫組織化学的証明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 濱 島 義 博 教 授 村 地 孝 教 授 早 石 修

### 論 文 内 容 の 要 旨

ポリ (ADP-リボース) は、酸化還元の助酵素 NAD より真核細胞核において合成される核酸様高分子である。その機能については未だ不明な点が多いが、DNA 合成、DNA 修復、細胞分化、癌化に関連しているといういくつかの報告がある。また、ポリ (ADP-リボース) が *in vivo* にも存在することはラジオイムノアッセイ等の種々の方法で確立されているが、詳細な細胞内局在は不明である。

著者は本ポリマーに対する特異抗体を用いた蛍光抗体法により、ラット諸組織におけるポリ (ADP-リボース) の存在を直接観察することに成功した。基質 NAD と仔牛胸腺より精製したポリ (ADP-リボース) 合成酵素を反応させ、生成したポリマーをハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー等によって精製した。このポリ (ADP-リボース) は平均鎖長24で、有意のタンパク、核酸を含まない。この標品を牛メチル化アルブミンおよびフロイントのアジュバントとともに家兎に免疫して抗体を調整した。得られた抗体は、DNA, RNA, ポリ(A), NAD, および ADP-リボースとは全く反応しない。また鎖長が3以上のポリマーに対しては、鎖長とともに、その反応性を増加する。

ラット諸組織を  $4\mu\text{m}$  の凍結切片とし、冷95%エタノールで10分間固定後、本抗体と反応させ、洗滌後、さらに FITC 標識ブタ抗ウサギ IgG と反応させ、グリセロール封入後、蛍光顕微鏡下にて観察した。

その結果、特異蛍光は核に局在し、とくにその辺縁部に強いことが認められた。ポリマーで吸収した抗体やポリ (ADP-リボース) を分解する酵素である蛇毒ホスホジエステラーゼあるいはポリ (ADP-リボース) グリコヒドラーゼで処理した切片では、この蛍光がみられないことから、この蛍光はポリ (ADP-リボース) に特異的と考えられる。また切片を、基質である NAD(0.2mM)と25℃30分間反応させてから抗ポリ (ADP-リボース) 抗体と反応させると、核の蛍光は著しく増強する。これは、核内のポリ (ADP-リボース) 合成酵素により外から与えられた NAD がポリ (ADP-リボース) に合成されたためと考えられる。細胞核にみられるポリ (ADP-リボース) の特異蛍光は、ラットの種々の組織、肝、脳、心、腸、膵、脾、腎、精巣、甲状腺、骨格筋にみられ、さらに、新生仔肝、再生肝、腹水肝癌にも程度の差はあ

っても、同様な所見が認められた。

例外は、血液細胞であり、ラット末梢血塗抹標本を冷95%エタノールで10分間固定後、抗ポリ(ADP-リボース)抗体と反応させても、白血球の核には蛍光は認められなかった。しかしNADと反応させてから、抗体と反応させるとリンパ球、単球の核には、特異蛍光が認められたが、顆粒球の核には、この条件下でも蛍光は見出されなかった。

現在まで、全ての有核細胞の核には、ポリ(ADP-リボース)の合成能が存在するとされてきたが、著者は、ラット末梢成熟顆粒球にはそれが欠如していることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

ポリADP-リボースはNADから合成される核酸様高分子である。著者は本ポリマーに対する抗体を得て、蛍光抗体法によってラットの諸組織におけるポリADP-リボースの局在を明らかにした。用いたポリADP-リボースは平均鎖長24で、得られた抗体はDNA, RNA, ポリ(A), NAD, モノADP-リボースとは全く反応しない。本抗体を用いて、ラットの諸組織を4 $\mu$ mの凍結切片とし、固定後本抗体と反応させ、さらにFITC標識ブタ抗ウサギIgGと反応させ蛍光顕微鏡下に観察した。特異蛍光は、ラットのすべての組織に観察され、核に局在することが認められた。唯一つの例外は顆粒球でリンパ球、単球の核には蛍光が認められた。ポリマーで吸収した抗体や、ポリADP-リボース分解酵素であらかじめ前処置するところの蛍光はみられず、あらかじめNADと切片を孵置すると蛍光が著しく増強することから、ポリADP-リボースに特異的であると考えられる。以上の研究はポリADP-リボースの局在を明らかにし、その生理的意義を解明する上に、寄与するところが多い。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。