

氏名	うえ だ やす じ 上 田 泰 次
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 1064 号
学位授与の日付	平 成 元 年 3 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	MONOCLONAL ANTIBODIES TO CHICK CRYSTAL- LINS (ニワトリクリスタリンに対するモノクローナル抗体)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 吉 澤 透 教 授 小 関 治 男

### 論 文 内 容 の 要 旨

ニワトリの水晶体特異タンパク質であるクリスタリンは、その分子サイズ、抗原性から、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\delta$ -クリスタリンの3種のクラスに分けられている。これらを抗原に8種類のモノクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットングおよび免疫組織化学によって、抗原性の分類、水晶体における分布を調べたのが、本研究の内容である。

8種類のモノクローナル抗体のうち $\alpha$ -クリスタリンに対する抗体は、2種類得られ、しかもそれらは $\alpha$ -クリスタリンのサブクラス $\alpha_A$ 、 $\alpha_B$ の一方のみを認識し、他方を認識しない抗体であることを明らかにしている。この結果は、 $\alpha_A$ の遺伝子が $\alpha_B$ のそれとハイブリッドを形成しないことや、ウシにおける $\alpha$ -クリスタリンのサブクラス間のアミノ酸配列の相同性が、60%しかないことと一致する。またこの2種類の抗体を用いた免疫組織学的解析によって、水晶体上皮の個々の細胞がこの両方の $\alpha$ -クリスタリンサブクラスを発現することを発見し、しかも、それぞれの細胞内分布が異なることを見いだしている。

一方、 $\beta$ -クリスタリンに対する3種類のモノクローナル抗体は、それぞれ交差反応せず別々のサブクラスを認識した。これらの $\beta$ -クリスタリンに対する抗体を用いてウェスタンブロットングを行った結果、19 kDaと26 kDaのポリペプチド、25 kDaのポリペプチドが、それぞれ1種類のモノクローナル抗体によって認識されることがわかった。また35 kDaのポリペプチドは、さらに別の抗体によって認識された。このことは、いままで $\beta$ -クリスタリンとして分類されていた1群のポリペプチドが抗原性のちがいで少なくとも3種類のグループに、分けられることを示している。

$\delta$ -クリスタリンに対しては、3種類のモノクローナル抗体が得られたが、これらの抗体はいずれも50 kDa  $\delta$ -クリスタリンを認識し、 $\alpha$ -や、 $\beta$ -クリスタリンとは反応しなかった。これらの抗体はいずれも、等電点電気泳動によって分けられる複数の $\delta$ -クリスタリン分子種をすべて認識した。この結果、これまで言われてきた $\delta$ -クリスタリンの分子多様性の存在を直接証明している。

なお、これらのうち2篇は、本研究で得られたモノクローナル抗体を用いた研究で、これらの抗体を組織特異的タンパク質の検出に利用したものである。

## 論文審査の結果の要旨

水晶体に特異的に存在するクリスタリンという一群のタンパク質は、ニワトリを中心に、各発生段階における発現の変化が調べられてきた。またクリスタリンの数多くのクラス、サブクラスのホモロジーについても、cDNAを用いて一部調べられている。タンパク質のレベルでこれらの分子を見分けるには抗体の使用が必須であるが、これまでに得られた抗体については、その特異性の低さから、詳細な解析に適していなかった。申請者は、ニワトリの主要なクリスタリンのほとんどに対するモノクローナル抗体の作製に成功し、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -クリスタリンの、分布、分類について新たな知見を加えた。

モノクローナル抗体作製の技術は近年確立されたものであるが、これをクリスタリンポリペプチドの解析に利用し、これまで特異性の高い抗血清が得られていなかったために一部混沌としていたクリスタリンの抗原性の違いによる分類を、ほぼ完成させたことに大きな意義がある。特に、 $\beta$ -クリスタリンについて、このクラスのクリスタリンは遺伝子ファミリーの産物であるとされてきたが、これがさらに抗原性によって分類されるという発見は、そのファミリーの分類と由来の検索につながる。また、 $\alpha$ -クリスタリンのサブクラスに対する抗体を用いた研究は、サブクラスの細胞内分布の違いという、新知見を提供するものである。また、このような特異的なモノクローナル抗体は、各クラス、サブクラスごとにクリスタリンの発現がどのように調節されているかを調べるための最も直接的な道具になり得るものである。現在クリスタリン遺伝子を用いて、発生生物学上のもっとも重要なテーマの一つである遺伝子の組織特異的発現機構の研究が進められているが、サブクラスごとの発現の調節を調べることは、そのような研究の基礎となり、大きな意味をもつものである。

以上のように、申請者の研究は発生、分化の研究に貢献し、クリスタリンの分子進化研究への新しい貢献も期待される。

参考論文は、本研究で得られた成果を他の研究に応用したものであり、本研究の意義をさらに強調するものである。

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。

なお、主論文および参考論文に報告された研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。