

Title	mRNA注入によるアフリカツメガエル卵母細胞における特異的抗体の産生とその性状について
Author(s)	原, 嘉宏
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/33310">http://hdl.handle.net/11094/33310</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

【3】

氏名・(本籍)	原 嘉 宏
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5918 号
学位授与の日付	昭和 58 年 3 月 3 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>mRNA 注入によるアフリカツメガエル卵母細胞における 特異的抗体の産生とその性状について</b>
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄 (副査) 教授 内田 驍 教授 松代 愛三

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

卵母細胞に外来性の mRNA を注入し、この mRNA が卵母細胞の中でどのように翻訳され、外来性の mRNA にコードされたたんぱく質が卵母細胞の中でどのような運命をとるかを知ることによって、そのたんぱく質の性質のみならず、細胞の機能を知ろうとする。具体的には抗原のはっきりしているハイブリドーマ mRNA を注入し、卵母細胞で作られた H鎖と L鎖がどのようにプロセッシングを受け、活性をもった抗体が作られるかどうかを調べた。

#### 〔方法ならびに成績〕

用いたハイブリドーマはジフテリア毒素 (分子量約 62,000) と反応し、C 端側分子量 17,000 の部分を欠いた CRM45 (分子量約 45,000) とは反応しない IgG1 を産生する。このハイブリドーマを BALB/C マウスの皮下に接種し、77g の腫瘍から RER 分画をとり、これからオリゴ (dT) セルロースを用いて約 2mg の mRNA 分画を得た。ラット肝 mRNA は核を落した上清から得た。

ツメガエル卵母細胞は成熟したメスを麻酔した後、腹壁を切開して卵巣をとり出し、パスツールピペットを用いて卵母細胞をとり出した。注入には先端を 20 $\mu$ m の直径に切ったガラスマイクロピペットを用い、0.5mg/ml の mRNA の水溶液を 1 個の卵母細胞あたり 30nl 注入した。これらの卵母細胞は 1 個あたり 5 $\mu$ l のバースのメデイウムの中で 20 $^{\circ}$ C でインキュベートした。

ハイブリドーマ mRNA を注入した卵母細胞を 0.3mCi/ml の  $^{35}$ S メチオニンを含むメデイウムの中で 24 時間ラベルした後、卵母細胞の細胞質とメデイウムをそれぞれ抗マウス IgG 血清、プロテイン A セファロースを用いて免疫沈降させた後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、H鎖、

L鎖共に分子量は腹水から精製したIgGと同一であった。非還元状態で泳動すると、2本のH鎖とL鎖が結合したIgG分子とL鎖のモノマーが見られた。これはハイブリドーマを<sup>35</sup>Sメチオニンでラベルして得られたものと同一であった。細胞質を膜分画とサイトゾル分画に分けるとIgGとL鎖のモノマーは膜分画に存在していた。卵母細胞の細胞質に存在するIgGとメディウムに存在するIgGをそれぞれ抗マウスIgG抗体を結合させたセファロースで沈降させ、二次元電気泳動を行うと、メディウム中のH鎖は細胞質のそれよりも等電点が約0.3酸性側にずれた所がドミナントなスポットであった。これらの等電点はハイブリドーマ細胞を<sup>35</sup>Sメチオニンでラベルして得られたものとそれぞれ一致した。L鎖には変化がなかった。

<sup>125</sup>Iでラベルしたジフテリア毒素とハイブリドーマmRNAを注入した卵母細胞を40時間インキュベートした細胞質とメディウムをそれぞれ反応させて抗マウスIgG血清で沈降させるとジフテリア毒素を沈降させることができた。マウス腹水から精製したIgGと比較して、卵母細胞ひとつあたり約1 nqのIgGを産生していることがわかった。またジフテリア毒素を結合させたセファロースで卵母細胞細胞質およびメディウムのIgGを沈降させることができた。

細胞質とメディウムをそれぞれコンカナバリンAセファロースカラムにかけると、メディウムのIgGはほとんど吸着しなかったが、細胞質のIgGは約75%吸着した。腹水から精製したIgGを二次元電気泳動した後ニトロセルロースのフィルターにブロットし、ヨードラベルしたレクチンと反応させたところ、ガラクトースに特異的なリシンレクチンとグルコサミンに特異的な小麦胚芽レクチンと反応したが、シアル酸に特異的なカプトガニレクチンは反応しなかった。

ラット肝mRNAとハイブリドーマmRNAを卵母細胞に注入して時間的に追っていくとアルブミンはメディウムに10時間以内に現れてくるがIgGは約40時間してからわずかにメディウムに現れてくる。

〔総括〕

卵細胞の中では、ハイブリドーマmRNAの翻訳が忠実に行われ、H鎖とL鎖が結合し、分子量および等電点がハイブリドーマのそれと等しい。また卵母細胞の中では約1 nqの抗原結合能のあるIgGが産生される。細胞質のIgGはハイマンノース型の糖鎖を持ち、分泌されたIgGは複合型である。卵母細胞は外来性のmRNAを忠実に翻訳し、活性をもった産物を作ることができる。活性を指標にmRNAを同定し得る可能性があり、活性のある抗体を卵母細胞の中で作れることから、膜成分に対する抗体をコードするmRNAを注入し、阻止効果をみることによって膜成分の機能を知る可能性がある。

## 論文の審査結果の要旨

カエル卵母細胞をmRNAからタンパク質に翻訳させる装置として用いる試みは多く行われており、ある種のタンパク質についてはその活性を再現することがあきらかにされている。本研究はこれまで明らかでなかったIgGの抗原結合活性について活性があることを明確に証明した。また、本研究では

分泌タンパク質の細胞内での移行過程について示唆のある結果も得られており、これらの過程を明らかにするための手段として抗体 mRNA を注入する方法が有用であることを示している。以上の点で学位に値すると評価される。