



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產生とその性状について
Author(s)	原, 嘉宏
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33310
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	原	嘉	宏
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	5 9 1 8	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	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產生とその性状について		
論文審査委員	(主査) 教 授	岡田 善雄	
	(副査) 教 授	内田 駿 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ードーマ 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]

用いたハイブリー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。このハイブリードーマを 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 20μm 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 5μl のバースのメディウムの中で 20℃ でインキュベートした。

ハイブリードーマ mRNA を注入した卵母細胞を 0.3mCi/ml の ³⁵S メチオニンを含むメディウムの中で 24 時間ラベルした後、卵母細胞の細胞質とメディウムをそれぞれ抗マウス IgG 血清、プロティン 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 ^{35}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 ^{35}S メチオニンでラベルして得られたものとそれ一致した。L鎖には変化がなかった。

^{125}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 ng 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プロットし、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ブ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 ng 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、阻止効果をみると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。