

アフリカツメガエル卵母細胞を用いるタンパク質 生合成のための簡易微量注入法

増村威宏・田嶋奈加子・古田雅一*・山形裕士**

竹葉 剛***・田中國介・藤井昭治

TAKEHIRO MASUMURA, NAKAKO TAJIMA, MASAKAZU FURUTA
HIROSHI YAMAGATA, GO TAKEBA, KUNISUKE TANAKA
and SHOJI FUJII

A simplified microinjection method for protein biosynthesis
in *Xenopus* Oocytes

要旨：アフリカツメガエル卵母細胞への RNA, DNA 等の細胞成分注入用の簡易な微量注入装置を考案, 試作した。この装置を用い特に植物性 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞へ注入しタンパク質生合成を行わせた。その結果, tobacco mosaic virus RNA, brome mosaic virus RNA, イネ glutelin 前駆体 mRNA, エンドウ ribulose 1,5 bis-phosphate carboxylase mRNA が忠実に翻訳され, 対応する polypeptide が形成されることを sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) による分子量の測定と免疫学的方法を組み合わせることにより確認した。

緒 言

アフリカツメガエルの卵母細胞や卵細胞に外来 messenger RNA (mRNA) を Micro-injection (微量注入) する技術が Gurdon¹⁾ らによって開発されて以来いろいろな生物からの mRNA がツメガエル卵母細胞内で翻訳されることが明らかになった。この方法によると、卵母細胞内へ注入された mRNA が正確に翻訳されるのみならず、翻訳されたタンパク質は acetylation, phosphorylation, glycosylation, signalpeptide の切断といった *in vitro* の翻訳系では不可能な修飾も受ける。

また DNA を直接卵母細胞に注入して忠実な転写を行わせることも可能²⁾ であり、この生細胞への生体成分の注入技術は遺伝子発現の研究に極めて重要な役割

を果たしている。しかしながら、この技術を駆使するためには、普通、高度の熟練と高価な装置を必要³⁾⁴⁾ とし、未経験者にとって有用と思われながら使用するためには強い抵抗が感じられた。本報告では、この手法の有用性を工夫しだいで手軽な手法の一つとして利用可能なことを示すために主に通常の実験室で使用される器具を流用して簡易な微量注入装置を考案試作したことを報告する。さらに、これまでアフリカツメガエル卵母細胞への動物性 mRNA の注入とその翻訳は比較的頻繁に行われてきたが、植物性 mRNA を翻訳させた例は少ない。このため、この装置を用い TMV-RNA, BMV-RNA, イネ登熟期胚乳 poly (A)⁺ RNA, エンドウ芽生え total RNA 等をツメガエル卵母細胞へ注入し翻訳産物を解析した結果について記し植物生

京都府立大学農学部生物化学教室

*京都大学食糧科学研究所食糧生産部門

**大阪医科大学公衆衛生学研究室

***京都府立大学生活科学部応用生物学研究室

昭和61年8月14日受理

化学, 植物分子生物学の分野においても有用な手法であることを示す。また微量注入法, 翻訳産物の解析の過程で工夫された手法についても記述する。

実験材料及び方法

アフリカツメガエル卵母細胞 (Xenopus Oocytes) の調製

1. アフリカツメガエルの飼育: 京都府立大学動物飼育室 (室温 25°C) で行った。

ツメガエル (Xenopus) は水槽に水を張り, その中で泳がせて飼育する。水は水道水を半日以上静置して脱塩素したものを用いる。市販観賞魚飼育用の浄化装置を使用し水交換は週に一回行った。飼料はツメガエル用の粉末エサ (清水動物 (京都) より購入) (1g/匹) を練り, 指で形状を整え週一回与えた。エサを与えて後30分以上たってからその日のうちに水の交換を行った。

2. 卵母細胞の摘出

A. 麻酔

卵母細胞を摘出するためにはカエルを麻酔させ動かなくさせる必要がある。そのために以下の二法を用いた。

エーテル法 成熟したメスガエルを用意し脱脂綿に吸着させたエーテルを, デシケーター下部に入れ, すのこをのせ, その上にツメガエルを入れてふたをする。麻酔がかかり動かなくなったら, デシケーターより取り出す。麻酔が深くかかり過ぎるとそのまま死ぬ場合がある。長くても5分程度にする。またエーテルが直接カエルの皮膚に付くと白変し表面を傷めるので注意

する。

冬眠法 摘出用のカエルの水槽に徐々に氷を加え水を冷却していく。約30分~1時間くらいで動かなくなる。冬眠したら氷上で摘出を行う。

B. 摘出

ピンセット, ハサミ, メス, 針, 糸, を70%エタノールで消毒しておく。

① エーテル法—まな板上に新聞紙を敷きその上にカエルをあお向けにする。

冬眠法—氷上にカエルをあお向けにし, さらに頭部や足の部分に氷をのせ, 腹部だけ出す。

② 外皮をピンセットで引っ張りメスで中央より左を3~4 cm 開く。(外皮はかたくすべりやすいので, 軽くメスでひっかけるようにしてピンセットでつまむとよい。)

③ 続いて卵巣の透けてみえるあたりの内皮を卵母細胞が取り出せる程度 (0.5 cm くらい) 切り開く。

C. 縫合

① ツメガエルの内皮を手術用の糸で一針縫い, その後外皮を二針縫う。

② 縫合を終えたツメガエルは抗生物質 (アンピシリン, ストレプトマイシン) (1 mg/ℓ) を含む水のはいった容器中へ移す。この時抗生物質の量が多いと副作用をおこすので注意する。

D. 摘出後の飼育

通常のタンパク質生合成実験には300~1,000ケの卵母細胞があれば充分である。従って, 1匹で4~5回の摘出が可能である。摘出を終えたカエルは他のカエルとは別に飼育し1~2日毎に水の交換を行う。2週

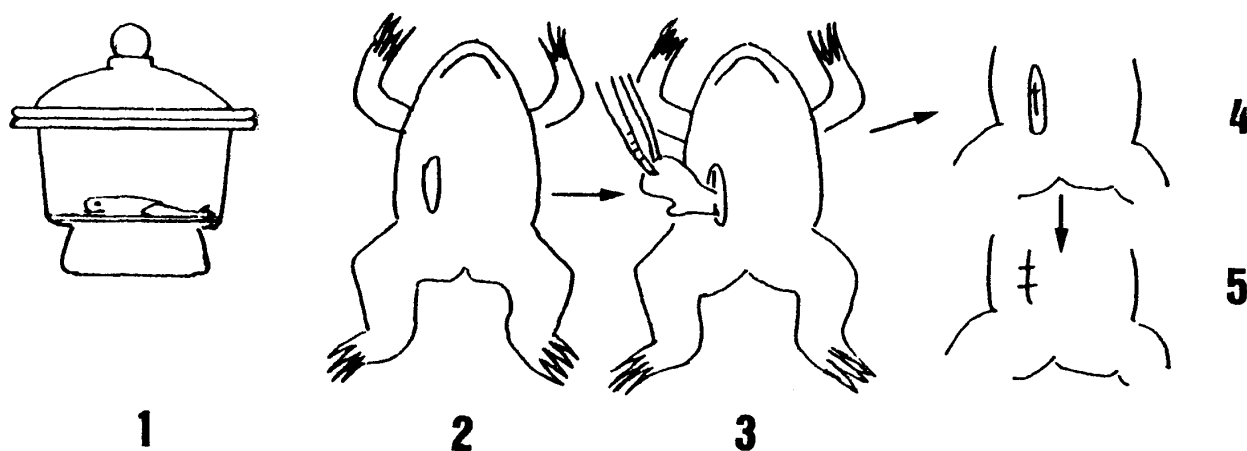


Fig. 1. Schematic Representation for Removal of Oocytes Under a Anaesthetized Xenopus.

1. Anaesthesia of a Xenopus
2. Incision in the ventral side of a Xenopus
3. Excision of Oocytes through an incision in the ventral side
4. Suturing the incision on the inner skin
5. Suturing the incision on the outer skin

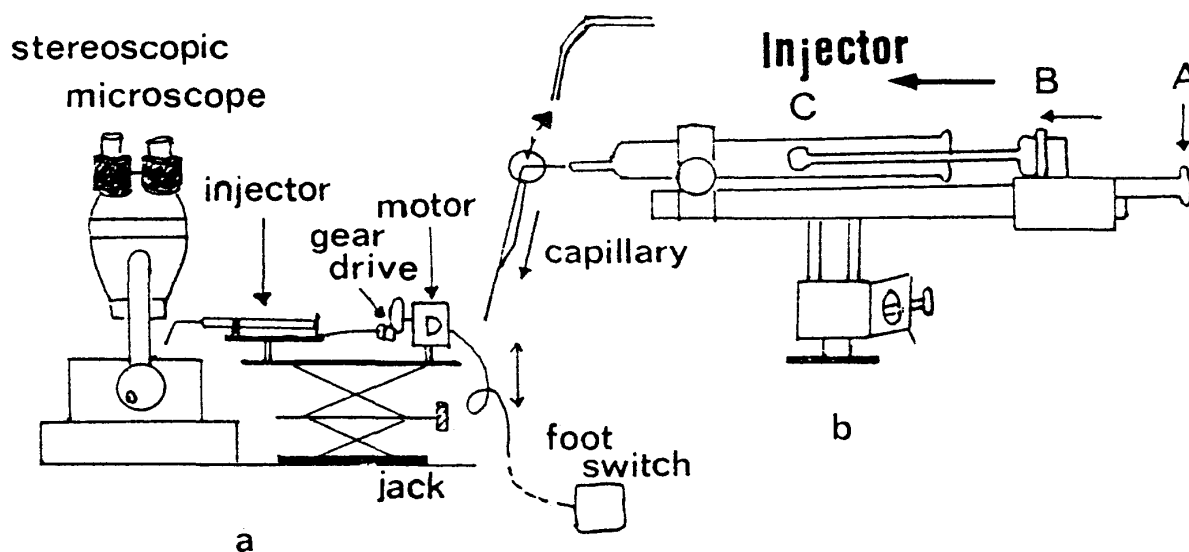


Fig. 2 Microinjection Equipments.

a. Display of equipments

b. Enlarged illustration of the injector

間は別にして, エサも与えないほうが良い。傷が閉じたら水槽へもどす。また卵母細胞をほぼ摘出し尽くしても, 6ヶ月程水槽中で飼育すると再び卵巣が再生する。

3. 微量注入装置の仕組み

この injector (図2) は A の部分を回転させることにより B 部が矢印方向へ移動する。この移動によって, シリンジのピストンを押して, インジェクションキャピラリーを通じて卵母細胞内へ試料を注入する仕組みになっている。A 部の回転は D のモーターにより, 一定の流速で外来 mRNA を卵母細胞へ注入することが出来る。モーターの駆動力はフットスイッチによって, クラッチを連結して伝わるよう設計した。(規格—シリンジ: 1,000 μ l, シリンジ台: ナルシゲ (1M-3), モーター: 1/3 rpm, インジェクターとしての能力: 500 μ m/1 回転) (モーターの作動時間が 60 s の場合, モーターの回転=1/3, シリンジより注入される量=2.77 μ l: 即ち, モーターの作動時間が 1 s の場合, モーターの回転数=1/180, シリンジより注入される量=46 nl) この簡易型インジェクターによって卵母細胞 1 個あたり 1 秒間に 40–50 nl の mRNA 溶液を注入することができる。

4. 微量注入操作

〈準備〉 ツメガエル 卵母細胞, mRNA, RNasin (Promega. Biotec. 20 U/ μ l) [35 S]-Met (Amersham >1,000 Ci/mmol) 又は [14 C]-Leu (NEN NEC-279 E 350 mCi/mmol) Barth's Medium, 50 mM PMSF (Phenyl Methyl sulfonyl Fluoride) (フッ化フェニルメチルスルフォニル) アイスボックス, 小型滅菌シャ

ーレ (Falcon 社 3001 Tissue Culture dish 35 \times 10 mm), ウィートン チューブ (WHEATON CRYULE VIAL 2 ml 滅菌済), パラフィルム (LABORATORY FILM AMERICAN 社), ピペットマン (Gilson 社 P-20, 200, 1000), 流動パラフィン (半井, 赤外線吸収測定用), 滅菌キャピラリーチップ (フナコシ, ULTIPETTE Capillary Tip CS-10 (滅菌済)), インジェクションキャピラリー (Drummond 社 Disposable Micro Pipette 50 μ l)

〈滅菌すべきもの〉 ピペットマンチップ (1000, 200, 20 μ l 用) ピンセット, スパチュラ (2本), Whatman 3 MM 2.4 CMS ペーパー, H₂O, エッペンドルフ チューブ (1.5 ml), はさみ (セラミック製), インジェクションキャピラリー (Drummond 社 Disposable Micro pipette 50 μ l キャピラリーをナルシゲ PN-3 を用いて作成する。またガスバーナーを用いて自作してもよい。はさみはバーナー等の火にかざして滅菌する。)

A. ツメガエル卵母細胞の準備 (図3)

① ツメガエルより摘出した卵母細胞を氷上でほぐす。Barth's Medium (\times 1) を適量かけ, 小型スパチュラ二本を用いて, 一個一個ほぐす。この際卵を傷つけないよう膜から静かにはがすようにする。

② 小型滅菌シャーレの中に 3 MM ペーパーを置き 120–170 μ l の Barth's Medium でしめらせる。その上へ 1000 μ l 用ピペットマンを用いて, チップ先端で吸い上げながら 1 個ずつのせる。この時卵母細胞の大きさ (stage V–VI) に注意し極端に大きなものや小さなものはさける。

B. mRNA の準備 (図4)

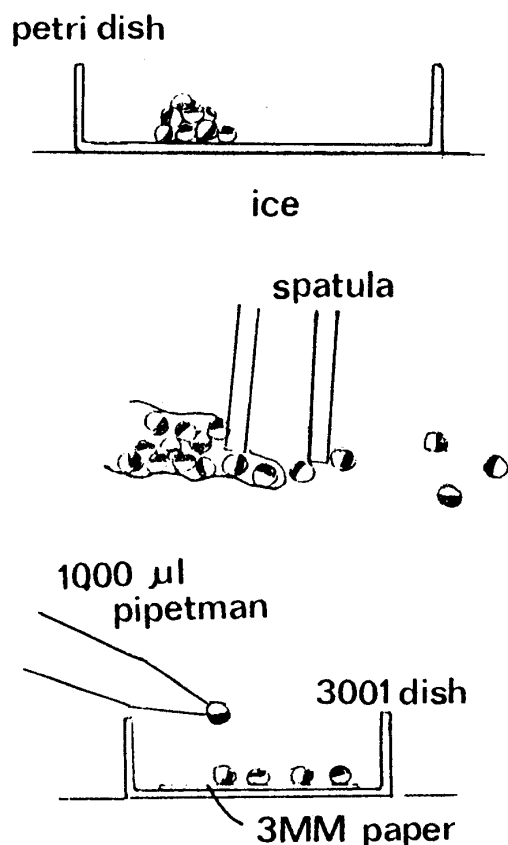


Fig. 3. Preparation of Oocytes for Injection.

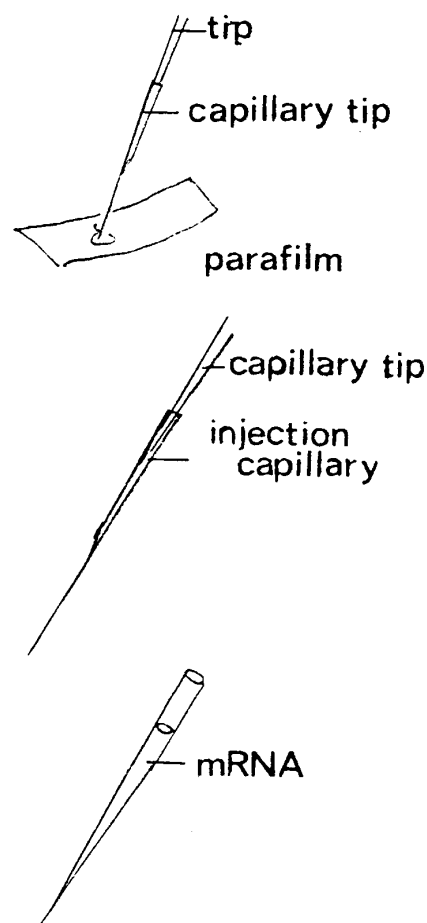


Fig. 4. Loading Micropipettes with Sample.

① パラフィルム (2cm×3cm 程度) 上で mRNA と RNasin を混合する。RNasin は mRNA の自己消化を防ぐために加えるが 2 units/µl, 1 mM DTT 液とする。

② 20 µl ピペットマンのチップの先に滅菌キャピラリーチップを付け、mRNA を吸い上げインジェクションキャピラリー中へ注入する。キャピラリーチップはできるだけ細いものを選ぶ。途中気泡が入った場合は水銀式体温計をさげる要領で、二、三度強く振ると良い。なお、TMV-RNA, BMV-RNA は京都大学農学部植物病理学研究室で調製されたものを用いた。また Pea の total RNA は京都大学食品工学研究室で調製されたものである。イネの poly (A)⁺RNA は登熟期イネ胚乳より常法に従って調製した。

C. 注入 (図5)

① mRNA を充填したインジェクションキャピラリーを流動パラフィン充填済のマイクロシリンジの先に付ける。この時気泡はいらないように気を付ける。

② インジェクションキャピラリーの先を滅菌したはさみで適当な大きさにカットする (外径 20~30 µm 程度)。大きすぎると注入の際卵母細胞がつぶれやすい。また細すぎると針先が卵母細胞内に入りにくかったり、mRNA が出にくいことなどがある。

③ 実体顕微鏡のステージに卵母細胞を並べたシャーレを置き接眼レンズをのぞきながらインジェクションキャピラリーが見えるように静かにインジェクターの位置を決める。

④ 左手で卵母細胞の並んだシャーレを持ち移動させながら右手でインジェクターのジャッキを上下させて注入していく。フットスイッチを踏み込み mRNA がキャピラリーの先から出てくることを確認したら踏んだままで、一個一個注入していく。一個につき約40nl の mRNA (通常 30 ng 程度の RNA) を約1秒ずつ刺していく。万一、卵母細胞がキャピラリーにさされたまま持ち上がった場合はピペットマンのキャピラリーチップなど細く柔らかいもので静かにとる。スパチュラ等かたいものを用いたり乱暴に扱っているとインジェクションキャピラリーが折れてしまうことがあるので細心の注意を払う。卵母細胞をほぐして並べる間は氷上で行うが、卵母細胞の乾燥に注意し 3 MM ペーパーで乾かないようにする。また、注入の際は常温となるので、できるだけ手際良く行わなければならない。実体顕微鏡のステージのライトを付けた場合は特に熱を持つため、注入が終了する都度消すように心がける。

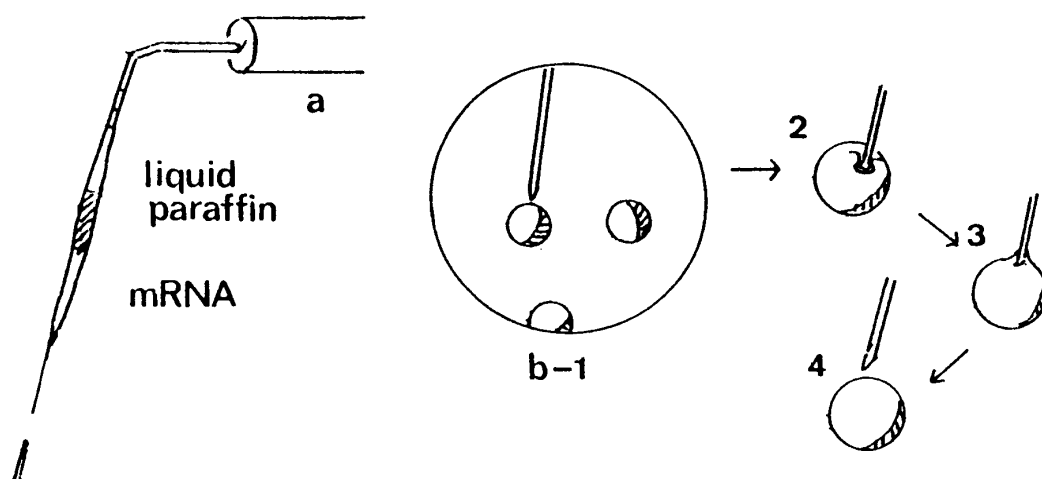


Fig. 5. Microinjection into Oocytes.

- a. Enlarged illustration of the injection capillary
- b-1. Decide a target oocyte through stereoscopic microscope
- b-2. Affirm micropipette stuck into an oocyte manipulating the handle of the jack
- b-3. Inject sample into an oocyte with proper sticking duration
- b-4. After injection, remove micropipette from an oocytes slowly

5. 生合成及び産物の解析

A. インキュベーション (図6)

① RNA の注入を終えた 卵母細胞 (通常30ヶ) の入ったシャーレ中に Barth's Medium を 150~200 μ l 加え卵母細胞が 3MM ペーパーから浮き気味になるようにする。卵母細胞をスパチュラで傷つけないよう静かに集めウィートンチューブへ移す。この時つぶれた卵母細胞はできるだけ除く。

② 卵母細胞といっしょに入った余分な Barth's Medium を一度ウィートンチューブからピペットマンを用いて吸い出す。

③ Medium を加えインキュベーションを開始する。
(インキュベーション Medium: 1本につき Barth's Medium ($\times 2$) 30 μ l, [35 S]-Met (1000 Ci/mmol) 2 μ l (30 μ Ci), 又は [14 C]-Leu (350 mCi/mmol) 20 μ l (2 μ Ci), H₂O (滅菌) で total 60 μ l にする。), 温度 20~22 $^{\circ}$ C, 時間20~24時間

B. 生合成されたタンパク質の抽出 (図7)

① mRNA を注入した卵母細胞を Medium ごとエッペンドルフチューブに移す。

② 約 1 μ l の 50 mM Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) を加え, スパチュラで卵母細胞をよくつぶしホモジネートする。(スパチュラ (小型) でつぶす方法は完璧に行うことは困難かもしれない。専用のホモジナイザー (ウィートン) 等を考慮する必要がある。)

③ その後遠心 (18,000 \times g) を約5分行い分画する。

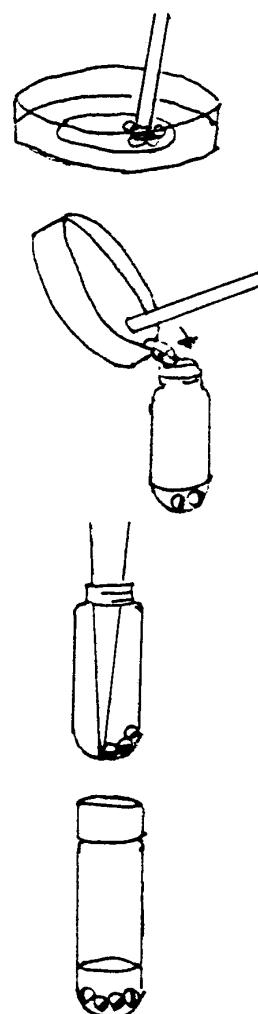


Fig. 6. Collection and Culture of the Injected Oocytes Removing an Excess Solution.

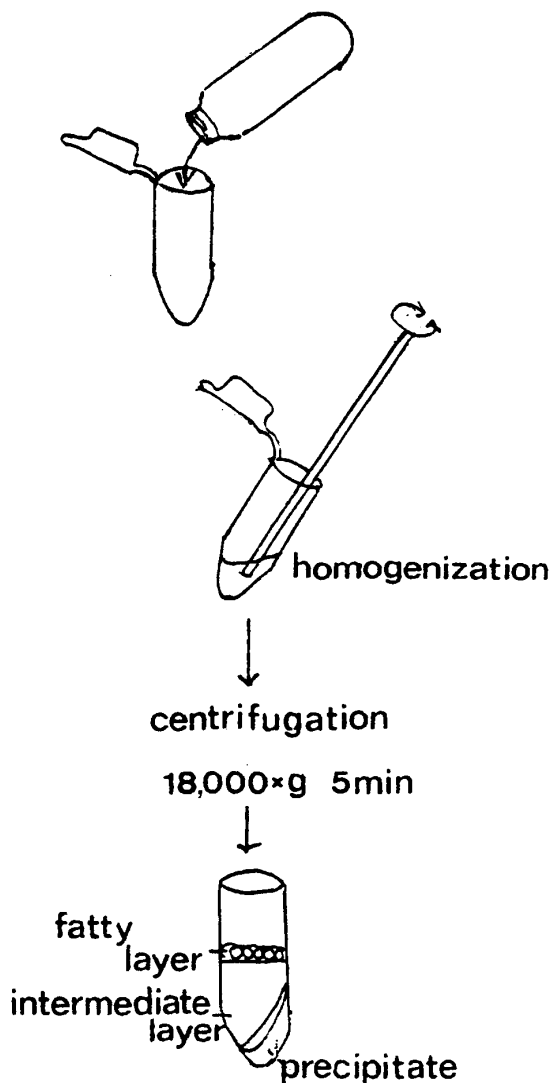


Fig. 7. Treatment of the Oocytes after Incubation.

その中間層を取り別のエッペンドルフチューブに移し -20°C で保存しておく。生産物が分泌性タンパク質の場合はホモジネートを行わずにそのまま遠心し、Medium 部分を取り出して貯蔵しておく。

C. SDS—ポリアクリルアミドゲル電気泳動

生合成されたポリペプチドの解析はわれわれの研究室で行われている常法⁵⁾に従った。即ち $12 \times 14 \text{ cm}$ で厚さ 1 mm のポリアクリルアミドゲルを用いた。なお、濃縮ゲルには 2.75% (W/V), 分離ゲルには $10 \sim 14\%$ のものを用い、アトー製製の電気泳動装置を用いた。泳動は 192 mM グリシンと 0.1% SDS を含む 25 mM トリス緩衝液を使用し指示色素であるプロモフェノールブルーがゲルの先端へ達するまで 125 V の印加電圧で行った。使用したサイズマーカーは、BSA (67 kDa), オボアルブミン (45 kDa), ペプシン (35 kDa) キモトリプシノーゲン A (25 kDa), β -ラクトグロブリン (18.4 kDa), リゾチーム (14.3 kDa) である。

0.25% クマシーブリリアントブルー R-250 を含む 45% MeOH, 9% 酢酸で染色した。脱色には 7.5% 酢酸, 5% MeOH を用いた。各ポリペプチドへの放射能の取り込みは Bonner と Laskey の方法⁶⁾に従い, Fuji X-RAY film (AIF RX $20.3 \times 25.4 \text{ cm}$) を用い -80°C で通常 3 日間～1 週間の露光を行った。

D. 二次元免疫ロケット法

Chua と Blomberg の方法⁷⁾に従った。使用したイネグレルリン抗血清は, Yamagata と Tanaka が記述した方法⁸⁾で調製した。BMV-ウイルスに対する抗血清は Okuno と Furusawa らの方法⁹⁾により BMV-ウイルスを精製後, RNA を分離し, 残渣中に存在するウイルスの全タンパク質を抗原として用い常法に従って抗血清を作成した。RuBisCO の抗体としては Sasaki らが調製した¹⁰⁾ IgG 画分を用いた。

実験結果

実験1 TMV-RNA の注入とその翻訳

30個のアフリカツメガエル卵母細胞に1卵母細胞あたり 40 nl (約 30 ng TMV-RNA) 注入後前述のインキュベーション法に従って $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ を取り込ませた。反応終了後1レーンあたりに抽出液 $3 \mu\text{l}$ (タンパク質画分への取り込み $134,000 \text{ dpm}$) を加えて 13.5% の分離ゲルを用いて分離した後, フルオログラフィーを行った。図8からわかるように TMV-RNA を注入した場合には $130 \sim 160 \text{ kDa}$ の部分に明確なバンドが観察され, TMV-RNA にコードされている polypeptide が生合成されたことを示している¹¹⁾。対照として蒸留水を注入したものについてはこの部位への放射能の取り込みは全く観察されず放射能の取り込みは注入 TMV-RNA に依存していることが示された。

実験2 BMV-RNA の注入とその翻訳産物の解析

TMV-RNA の場合と全く同様に BMV-RNA を注入し $[^{35}\text{S}]\text{-Met}$ を用いて卵母細胞中でのタンパク質生合成を行わせた。各レーンにタンパク質あたり $138,000 \text{ dpm}$ 程度の卵母細胞からの抽出液を加え, 13.5% の分離ゲルを用いて分離後フルオログラフィーを行った。その結果, 図9A, レーン2からわかる通り, 卵母細胞のみ(レーン1)や, 蒸留水(レーン3)を注入した場合には見られないバンドが 20 kDa の部位に観察された。一方, 一次元目に上記レーン2と同様の電気泳動を行った後, その泳動を直角方向へ二次元目の免疫電気泳動を行った。その後, フルオログラフィーを行った結果が図9Bである。その結果は, 20 kDa タンパク質の部位に強くロケット像が表れており, BMV-ウイルスの外被タンパク質が生合成されていること

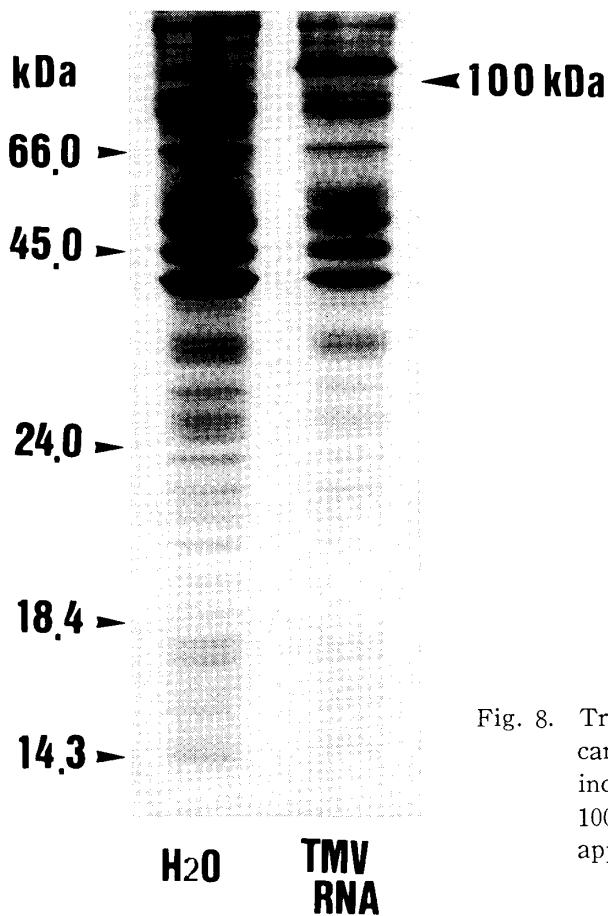


Fig. 8. Translation of TMV-RNA. Fluorography was carried out, after microinjection followed by incubation with [³⁵S]-methionine, larger than 100 kDa polypeptides due to TMV-RNA were appeared.

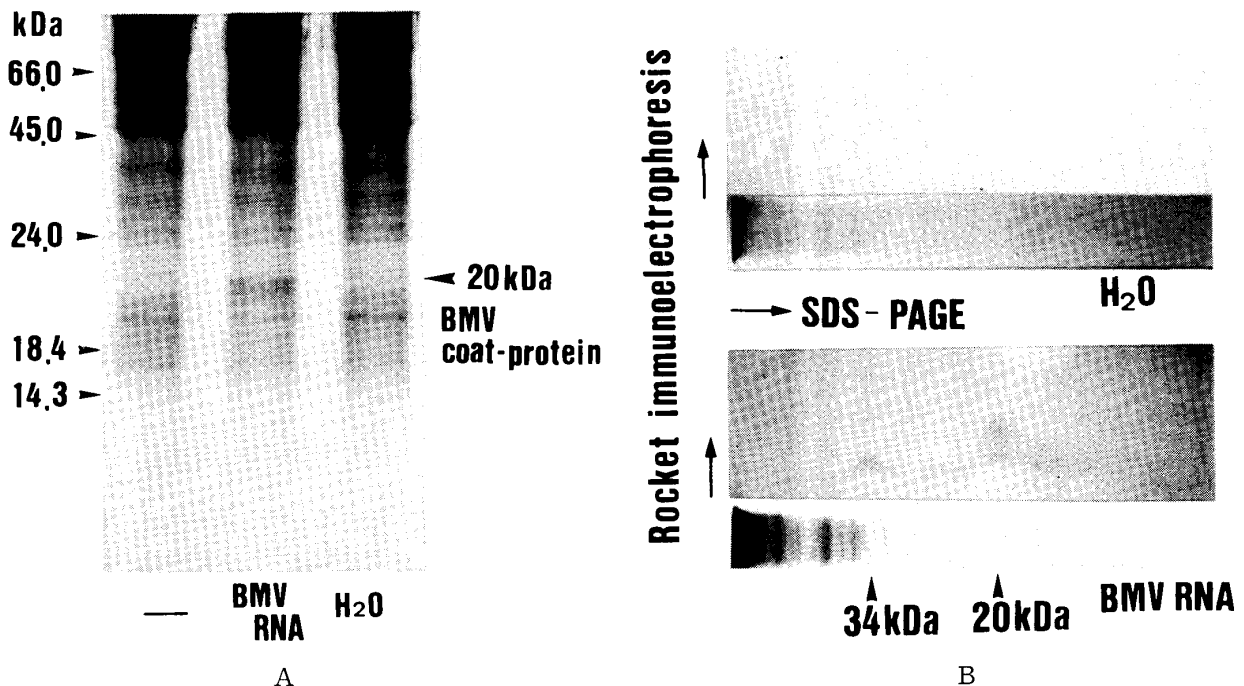


Fig. 9. Translation of BMV-RNA. Fluorography was carried out, after microinjection followed by incubation with [³⁵S]-methionine.
A. An SDS-PAGE showing the formation of 20 kDa coat-protein of BMV.
B. After SDS-PAGE, immunoelectrophoresis using rabbit antibody against BMV was carried out.

を示している¹²⁾。なお、34 kDa 付近のロケット像もウイルス性タンパク質が生合成されていたことを示している。これらのロケット像は対照として蒸留水を注入した場合には観察されなかった。

実験3 登熟期イネ種子胚乳より調製した poly (A)⁺ RNA の注入と 57 kDa イネグルテリン前駆体の生合成の確認

登熟期イネ種子より調製した poly(A)⁺RNA¹³⁾¹⁴⁾ を注入し [¹⁴C]-ロイシン液 (2μ Ci¹⁴C) を含む全量 60μl のインキュベーション液でタンパク質への取り込み実験を行った。この実験では反応後、インキュベーション液へ登熟胚乳のグロブリン画分 (50 μg タンパク質) をキャリアーとして添加した後、常法に従って卵母細胞から反応産物を抽出し SDS-PAGE を行った。その後、実験2と同様二次元目にイネグルテリンに対する抗血清を用いる免疫電気泳動を行った。最後にフルオログラフィーを行った結果を図10に示す。一次元目の SDS-PAGE 後のタンパク質染色のみでは内在性のタ

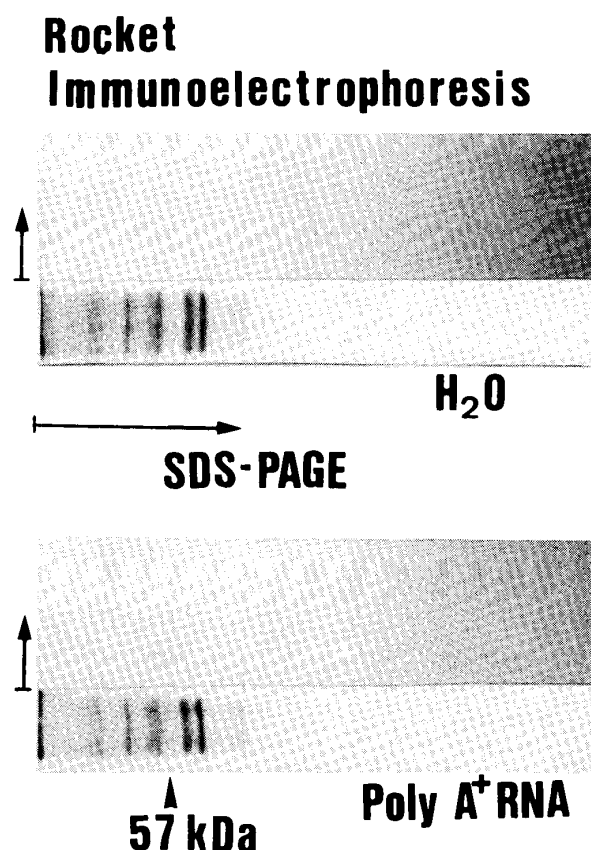


Fig. 10. Translation of Rice Glutelin Precursor. After microinjection of developing rice endosperm poly(A)⁺RNA followed by incubation with [¹⁴C]-leucine, fluorography was carried out. Precipitin arcs were formed at the position of 57 kDa glutelin precursor, when poly(A)⁺RNA of rice endosperm was microinjected.

ンパク質による染色が強く poly(A)⁺RNA を注入した場合と蒸留水を注入した場合でパターンに差はみられない。しかしながら、二次元目の免疫電気泳動を行った後のフルオログラムでは poly(A)⁺RNA を注入した場合のみ 57 kDa 部位に明確なロケット像を観察する事ができた。このことは卵母細胞へ注入されたイネ胚乳中のグルテリン前駆体 (57 kDa ポリペプチド) mRNA が忠実に翻訳されたことを示している。

実験4 エンドウ芽生え total RNA の注入と翻訳

本報告で述べた方法によりエンドウ芽生え total RNA を卵母細胞へ注入し、[³⁵S]-メチオニン (23 μ

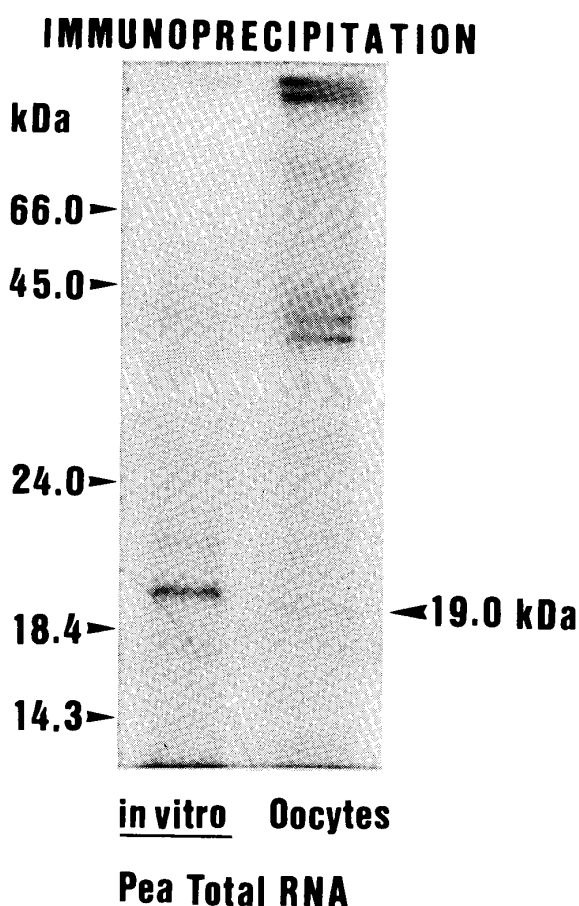


Fig. 11. Synthesis and Processing of Pea RuBisCO Small Subunit Precursor in Xenopus Oocytes.

Oocytes-Oocytes were incubated with [³⁵S]-methionine after microinjection of total RNA obtained from pea seedlings. Immunoprecipitation with rabbit antibody against pea RuBisCO small subunit was carried out before SDS-PAGE.

in vitro-After translation of total RNA obtained from pea seedlings in rabbit reticulocyte lysate, immunoprecipitation using rabbit antibody against pea RuBisCO small subunit was carried out.

Ci) と共に 全量 60 μ l でインキュベートした。その後、抗エンドウ葉 RuBisCO 小サブユニットウサギ IgG を用い反応産物の免疫沈澱を得た。沈澱として得られたタンパク質画分 (12,500 dpm) について、SDS-PAGE を行い、さらにフルオログラムを得た。その結果、19 kDa 近辺に premature 小サブユニットの形成を示すバンドの存在を確認した。なお、エンドウ芽生えから得た total RNA のウサギ網状赤血球を用いる無細胞タンパク質生合成系¹⁵⁾ ($[^{35}\text{S}]$ -メチオニン使用) による産物を同時に泳動したが、この場合 20 kDa の先駆体¹⁶⁾の合成は認められるものの 19 kDa premature 小サブユニットの形成は確認できなかった。このことにより、卵母細胞系は、網状赤血球を用いる無細胞系と同様に RuBisCO の小サブユニット mRNA を鋳型とするタンパク質生合成を進めると共に無細胞系では不可能な生合成された前駆体のプロセッシングも行うことを示した。

考 察

通常、市販の微量注入装置は非常に高価であるが、本報告に示した微量注入装置は普通の生物系の実験で日常的に使用している器具ばかりであり容易に組み立て得る。

この装置では卵母細胞の位置決定を左手を用いて行う。一方、卵母細胞へのキャピラリーの穿刺操作は右手でジャッキのハンドルを操作することにより行う。また試料である mRNA 等の注入をフットスイッチを通じて行えるため短時間に多数の卵母細胞への注入が可能である。この注入のモータードライブ方式は卵母細胞への注入時に連続的に試料がキャピラリーから射出されるため液切れせず、手動式より有利である。

また本法では、注入のための圧力伝達に長いプラスチックチューブ等を全く使用していないため圧力伝達に伴う遊びがほとんどなく、単位時間あたりの試料注入量は極めて安定している。この単位時間あたりの注入量は図 2 に示した C のマイクロシリンジを取り替えることにより 46 nl/秒 から 5 nl/秒 程度まで容易に変えることが出来る。

この注入装置の改良点としては卵母細胞の位置決定のための左手の操作を機械的に X 軸、Y 軸に沿う移動装置によっても行うことができるが、直径 1 mm 程度の卵母細胞を扱うためには手動によっても差し支えないであろう。むしろ、手動のほうが微妙な制御は楽かも知れない。また、穿刺操作をジャッキを用いて行っているが専用装置を工夫することにより、よりスムーズなキャピラリーの卵母細胞への穿刺が可能かもしれ

れない。

この装置を用いて注入した mRNA 標品は植物ウイルス RNA および植物組織より得た poly (A)⁺RNA であるが、調査したこれらの mRNA は全てアフリカツメガエル卵母細胞中で忠実に翻訳された。ただ TMV-RNA と BMV-RNA の翻訳で判明したとおり卵母細胞によっては翻訳に適した mRNA とそうでない mRNA が存在するようであり、同じ植物 RNA でも TMV-RNA は BMV-RNA より卵母細胞においてより良く翻訳された。その他の植物性 mRNA の多くが容易に翻訳可能であることが判った。また RuBisCO 小サブユニットの翻訳でも判る通り、無細胞系では不可能な生合成された植物タンパク質の前駆体のプロセッシングも可能であることが示された。

アフリカツメガエル卵母細胞へのマイクロインジェクションによるタンパク質生合成では、小麦胚芽や網状赤血球ライゼート系を用いる場合より、内在性タンパク質の生合成が強い。そのため、外部からの mRNA の注入が卵母細胞全体でのタンパク質生合成に対する添加効果を示さない。卵母細胞を用いるタンパク質生合成では通常、外来成分の注入による内在性のタンパク質の生合成が阻害されるためタンパク質合成は全体的に低下する。また、外来 mRNA を注入しても多くの場合内在性のタンパク質合成と SDS-PAGE 等の分析でバンドが重なるため新しく合成されるタンパク質の同定が難しい場合がある。しかし、実験 2 と 3 で示したように二次元の免疫電気泳動とそのフルオログラフィを組み合わせることによって、植物の外来 mRNA に基づくタンパク質生合成についてもその生合成を確認することが可能であることが明らかにできた。

以上、本報告で記述した簡便な微量注入法を用いることによりアフリカツメガエル卵母細胞系で植物性 mRNA の同定、更に植物性タンパク質の生合成に伴う修飾、輸送の機構解析が容易に行えることが示された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、TMV-RNA と BMV-RNA を使用させていただいた京都大学農学部植物病理学教室古沢巖氏および RuBisCO 小サブユニットのウサギ IgG とエンドウ total RNA を提供して下さった京都大学農学部食品工学教室の佐々木幸子氏に心から感謝いたします。

また、本論文作成に関する資料整理等について平松光子氏に御協力いただいた。

参 考 文 献

- 1) J. B. Gurdon, C. D. Lane & H. R. Woodland (1971) Use of Frog Eggs and Oocytes for the study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells, *Nature*, **223**, 177-182.
- 2) A. Kressmann, S. G. Clarkson, V. Pirrotta, and M. L. Birnstiel (1978): Transcription of cloned tRNA gene fragments and subfragments injected into the oocyte nucleus of *Xenopus laevis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1176-1180.
- 3) 寺岡 宏, 玉木幹男, 田中兼太郎 (1981): マイクロインジェクション, 蛋白質・核酸・酵素, **26**, 602-607.
- 4) Alan Colman (1984): Transcription and translation, IRL Press, 271-302.
- 5) U. K. Laemmli (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) W. M. Bonner, R. A. Laskey (1974): A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels, *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83-88.
- 7) N. H. Chua, F. Blomberg (1979): Immunohistochemical Studies of Thylakoid Membrane Polypeptides from Spinach and *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **254**, 215-223.
- 8) H. Yamagata (1982): Biosynthesis and Accumulation of Storage Proteins in Rice Plant, 京都大学農学部, 学位申請論文 (京大農学博士), 42-44.
- 9) T. Okuno, I. Furusawa (1979): RNA polymerase activity and protein synthesis in Brome Mosaic Virus-infected protoplasts, *Virology*, **99**, 218-225.
- 10) Y. Sasaki, Y. Tomoda, H. Tomi, T. Kamikubo, K. Shinozaki (1985): Synthesis of ribulose biphosphate carboxylase in greening pea leaves, *Eur. J. Biochem.*, **152**, 179-186.
- 11) G. Bruening (1981): The Biochemistry of Plants Vol. 6, Academic Press, 578-590.
- 12) G. Bruening (1981): The Biochemistry of plants Vol. 6. Academic Press, 590-598.
- 13) 田中國介 (1985): 植物バイオ工学細胞育種技術実験法, サイエンスフォーラム, 101-104.
- 14) T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982): Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory 188-198.
- 15) H. R. B. Pelham, R. J. Jackson (1976): An Efficient mRNA- Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates, *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247-256.
- 16) N. H. Chua, G. W. Schmits (1978): Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6110-6114.

Abbreviations

BMV	brome mosaic virus	RuBisCO	Riburose 1,5 bisphosphate Carboxylase/ Oxygenase
dpm	decay per minute	SDS	Sodium dodecyl sulfate
DNA	deoxyribonucleic acid	TMV	tobacco mosaic virus
mRNA	messenger ribonucleic acid	DTT	Dithiothreitol
Poly(A) ⁺	poly adenylic acid	MeOH	Methanol
RNasin	Ribonuclease inhibitor		

Summary

A simplified and convenient microinjection system to inject cell components such as DNA and RNA into *Xenopus* oocytes was devised and constructed. By use of this system, RNAs of plants were injected into *Xenopus* oocytes, then their protein syntheses were examined. Tobacco mosaic virus RNA, brome mosaic virus RNA, rice

glutelin precursor mRNA, and pea Riburose 1,5bisphosphate carboxylase mRNA were faithfully translated. The nature of the synthesized polypeptide was confirmed by fluorography using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoelctrophoresis.