

- 507 無細胞タンパク質合成系を用いた PNA と S-oligo のアンチセンス効果の評価 (1 岐阜大・農、2 日本製粉(株)、3 名大・農)
○山田晃子¹ 鈴木徹¹ 河合啓一¹ 布藤聡² 瀧屋俊幸² 中野秀雄³

【目的】アンチセンス法は、mRNA と相補的な構造を持つ核酸を用いる遺伝子発現制御法であり、様々な分野への応用が期待されている。しかしながら、アンチセンス分子の作用機構は不明な点も多く、これらの早期解明が強く望まれている。そこで、本研究では無細胞タンパク質合成系を用い、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)の投与量を変化させ、アンチセンス効果に及ぼす AON の配列及び基本骨格の違いの影響について検討した。

【方法及び結果】大腸菌 S30 抽出液と T7 ポリメラーゼを用いた無細胞タンパク質合成系においてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を発現させた。この際、CAT 遺伝子に対し発現抑制効果を持つ4種類の配列をS-oligo 及びPNA で作製し、終濃度を5段階に変化させて反応系に加えた。その結果、AON が示す発現抑制効果の濃度依存性は配列や基本骨格により様々な違いがみられた。

Evaluation of the antisense-effect of peptide nucleic acid(PNA) and s-oligonucleotide using cell free protein synthesis

○¹Akiko Yamada, ¹Tohru Suzuki, ¹Keiichi Kawai, ²Satoshi Futo, ²Toshiyuki Takiya, ³Hideo Nakano (1Gifu University, 2Nippon Flour Mills, 3Nagoya University)

【Key words】peptide nucleic acid(PNA), phosphorothioate oligonucleotide(S-oligo), antisense oligonucleotide(AON), Cell free protein synthesis, CAT

- 508 抗体/受容体キメラを用いた EPOR-gp130 細胞内ドメインヘテロダイマーの機能解析 (1 東大・工・化生、2 東北大・工・生工、3 Roche)
○河原正浩¹, 上田宏¹, 津本浩平², Walt Mahoney³, 熊谷泉², 長棟輝行¹

【目的】サイトカインファミリーに属するエリスロポエチン(EPOR)、IL-6 はそれぞれ EPOR、gp130 のホモダイマー形成を通して増殖分化の信号伝達を行う。今回我々は通常細胞内に存在しないとされる EPOR-gp130 細胞内ドメイン間ヘテロダイマー形成を抗体/受容体キメラを用いて人為的に誘導し、信号伝達の可能性を検証した。

【方法及び結果】EPOR の細胞外ドメインを抗 hen egg lysozyme(HEL)抗体 HyHEL-10 の可変領域 VH または VL で置換したキメラレセプター(HE, LE)、およびその細胞内ドメインを gp130 に置換したもの(Hg, Lg)を作製した。Hg、LE を IL-3 依存性血球細胞である Ba/F3 に同時導入し発現させたクローンは HEL 濃度依存的に増殖し、EPOR によって活性化される転写因子 STAT5 がリン酸化されていることが分かった。免疫沈降の結果、Hg と LE は HEL がいない状態でもある程度ダイマーを形成しており、HEL 添加による受容体コンホメーション変化が活性化に重要であることが示唆された。

【将来の展開】ヘテロダイマー形成を特異的に誘導できる本研究の手法により、EPOR-gp130 以外にも機能的なヘテロダイマーを発見できる可能性がある。

Functional analysis of EPOR-gp130 cytoplasmic domain heterodimer with the use of antibody/receptor chimera.

○Masahiro Kawahara¹, Hiroshi Ueda¹, Kouhei Tsumoto², Walt Manoney³, Izumi Kumagai², Teruyuki Nagamune¹ (1Dept. Chem. Biotechnol., Univ. Tokyo, 2Dept. Biomol. Eng., Tohoku Univ., 3Roche)

【Key words】erythropoietin receptor, gp130, signal transduction, signal crosstalk, growth control, hen egg lysozyme