熊本大学理学部理学科生物コース卒業論文

アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）初期胚の生殖質に局在する

XTdrd6タンパク質の機能解析

令和5年1月31日

浦川七海

目次

第1章序論　１

第2章　材料と方法2

2-1　実験動物及び試薬2

2-2 　抗原発現用大腸菌の調整 3

2-2-1　プラスミド抽出3

2-2-2　トランスフォーメーション3

2-3　抗体精製 4

2-3-1　抗原溶液の調達 4

2-3-2　Chelating Sepharose Fast Flow 4

2-3-3　CNBr-activated Sepharose 4Bを用いた抗原カラムの精製 5

2-3-4　抗XTdrd6抗体の精製 5

2-3-5　タンパク質の定量 6

2-4　 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 6

2-5　ウェスタンブロット 7

2-5-1　PVDF膜への転写 7

2-5-2　抗体の検出 7

2-6　　免疫組織化学 7

2-6-1　精巣の固定・脱水・包埋 7

2-6-2　切片の前処理 8

2-6-3　抗体反応 8

2-6-4　hematoxylene・eosin染色 9

2-7　32細胞胚植物極割球への抗体顕微注射 9

2-7-1　ガラスマイクロピペットの作成 9

2-7-2　胚の調整 9

2-7-3　マイクロインジェクション 10

第3章　結果11

3-1　抗XTdrd6抗体の精製11

3-2　植物極割球への抗体の顕微注入11

第4章　考察13

第5章　参考文献15

第6章　図版の説明17

要旨

*XTdrd6*（*Xenopus Tudor Domain containing 6*）遺伝子は、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）成体の生殖細胞で特異的に発現する遺伝子として見つかった。XTdrd6タンパク質は、原腸胚など初期胚の生殖質に蓄積しており、その生殖質を受けとった始原生殖細胞にも存在し続けている。本研究では、生殖質に蓄積しているXTdrd6タンパク質の機能を抗XTdrd6抗体で阻害したときの生殖細胞分化への影響を調べた。

抗原カラムを用いてアフィニティー精製した抗XTdrd6抗体とFITC・dextran・lysine（FDL）を混合したものを、32細胞期の生殖質が存在する植物極の4つの割球に顕微注入した。この割球からは、生殖細胞に加え、腸などの内胚葉性組織が分化してくる。顕微注入した胚を生殖細胞が生殖巣に入り込んだSt.49まで飼育したところ、抗体を注入していない胚の集団に比べ正常発生率が悪くなっていった。このことから、抗体の影響が発生に出ている可能性が考えられた。しかし、正常に発生している個体を観察すると、抗体を注入した割球由来の腸形成はきちんとしていた。このように、正常発生しているSt.49の生殖巣の部分を蛍光顕微鏡で観察したところ、抗体を注入していない胚では数多くの生殖細胞がFDLで標識されていた。一方、抗体を注入した個体でもFDL標識された生殖細胞は確認できたが、その数はほとんどの個体において非常に少なかった。以上の結果から、抗XTdrd6抗体の注入により生殖細胞形成が阻害されることがわかった。