1. 序論

*XTdrd6*（*Xenopus Tudor Domain containing 6*）遺伝子は、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）成体生殖細胞で特異的に発現する遺伝子として見つかった（Ikema et al.,2002）。発生過程では、St.Ⅰ/Ⅱの卵母細胞ですでに転写・翻訳されており、母性因子として発生開始後の神経胚期くらいまで胚全体に存在しているものの、それ以降体細胞からは消失していく（Ikema et al.,2002; Hiyoshi et al., 2005; Mostata et al., 2009）。一方、生殖質には非常に多くのXTdrd6タンパク質が蓄積しており（Mostata et al., 2009）、その後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（杉本、2007）。XTdrd6タンパク質には、他のタンパク質と相互作用することが知られているtudorドメインが複数存在している（Ikema et al.,2002）。このことから、XTdrd6タンパク質と相互作用しているタンパク質の解析が行われ、翻訳制御に働くFRGY2や減数分裂や細胞分裂を制御するタンパク質をコードするmRNAと複合体を形成していることが明らかになった（Mostata et al., 2009）。その後、複合体に含まれる*XL-INCENP* mRNAの翻訳を制御していることが示された（Ohagi et al., 2012）。XTdrd6タンパク質が最も多く蓄積している生殖質にも*XDazl* mRNAや*XDEAD end* mRNAなどが局在しており、生殖質に存在するXTdrd6タンパク質もこれらmRNAの翻訳制御を通して始原生殖細胞分化に関わっていると予想される。

そこで本研究では、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。

第2章　材料と方法

2-1　実験動物及び試薬

アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の成体は、ワタナベ増殖（兵庫）より購入した。アフリカツメガエルは20℃で飼育し、アフリカツメガエル用飼料（ワタナベ増殖）を餌として与えた。

本研究で使用した試薬類は、特に断らない限りNacalai Tesque,Inc.より購入したものである。本文中略称で示した試薬類の名称は以下のとおりである。

AP: alkaline phosphatase

APS: ammonium peroxydisulfate

Amp: ampicillin sodium salt

BPB: bromophenol blue

CBB: coomassie brilliant blue

FDL: Dextran, Fluorescein, 10,000 MW, Anionic, Lysine Fixable (Fluoro-Emerald)（Invitrogen）

FITC: fluorescein isothiocyanate

IPTG: isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

MMR: Marc’s Modified Ringers

NBT/BCIP: nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4chloro-3’-indolylphosphatase p-toluidine sait

PVDF: polyvinylidene difluoride（Merck Millipore）

SDS: sodium lauryl sulfate

TEMED: N,N,N’,N’-tetramethylenediamine

Tris: Tris（hydroxymethyl）aminomethane

2-2 　抗原発現用大腸菌の調整

2-2-1　プラスミド抽出

Plusgrow/Ampプレート（25μg/mlのAmpを含んだPlusgrow, 1.5％ w/v agar）上に増殖したXTdrd6 tudor 5&6 in pET 21a/XL1 BlueからWizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを用いて目的のプラスミドDNAを抽出した。Plusgrow/Ampプレートからコロニーを爪楊枝でかき取り、250μlのCRA（50mM Tris-HCl ; pH 7.5 , 10mM EDTA, 　　　100µg/ml RNase A）に懸濁した。次に、250μlのCLA（0.2M NaOH, 1% SDS）と10μlのAlkaline Protease Solutionを加え穏やかに転倒混和し、室温で5分間インキュベートし、さらに350μlのNSB（4.09M guanidine hydrochloride, 0.759M potassium acetate, 2.12M glacial acetic acid）を加え穏やかに転倒混和した後、遠心（21,000g, 5min, 23℃）した。上清をカラムに移し遠心（21,000g, 1min, 23℃）した。フロースルーをデカントで捨て、750μlのCWA（162.8mM potassium acetate , 22.6mM Tris-HCl ; pH 7.5 , 0.109mM EDTA (pH 8.0)）をカラムに入れて遠心（21,000g, 1min, 23℃）した。フロースルーをデカントで捨て、250μlのCWAをカラムに入れて遠心（21,000g, 2min, 23℃）した。カラムを新しい1.5mlチューブに入れ替え、30μlのNuclease-Free Waterを加えて5分静置した後に遠心（21,000g, 1min, 23℃）した。その後さらに20μlのNuclease-Free Waterを加えて5分静置した後に遠心（21,000g, 1min, 23℃）した。フロースルーをプラスミドDNA溶液として回収した。

2-2-2　トランスフォーメーション

Competent細胞（*Escherichia coli* BL21 株）50μlに4μlの抽出したプラスミドDNAを加え、氷上に30分間置いた。その後、42℃で50秒処理し、再び氷上に置いた。そこに500μlのPlusgrow/Amp（25μg/mlのAmpを含んだPlusgrow）を加え37℃ 30分保温した。そのうち300μlをPlusgrow/Ampプレート（1.5％ w/v agar）上にまいてコロニーを形成させた。5mlのPlusgrow/Ampプレートに形成したコロニーを植菌し、3時間振盪培養した。培養した菌3.5mlに1.5mlの50% glycerolを混合し、1mlずつ1.5mlチューブに分注した後、-80度で凍結保存した。

2-3　抗体精製

2-3-1　抗原溶液の調達

250ml LB/Amp（25μg/mlのAmpを含んだLB）溶液に2-2-2で凍結保存しておいた金溶液1mlを加え、37℃で培養した。600nmの吸光度（OD600）が0.5～0.6になったところで0.5MのIPTGを250μl入れ、37℃で2時間培養した。その後、50mlチューブに移し、遠心（1,500g, 30min, 4℃）した。遠心後に沈殿物を10mlの溶液A（300mMNaCl , 20mMTris-HCl; pH8.0）に懸濁した。懸濁液を50mlチューブに移し、超音波処理（φ14 , DUTY 60, OUTPUT 4: TOMY）を3分、休み3分を5回繰り返した。その後1.5mlチューブに分注して遠心（21,000g, 2min, 4℃）し、上清を取り出した。1mlの溶液Aにimidazoleを溶かし、上清に加えた。この時、全体のimidazoleの濃度が10mMになるようにimidazoleの量を調節した。

2-3-2　Chelating Sepharose Fast Flow

2mlのChelating Sepharose Fast Flow（Pharmacia Biotech）をカラムに入れ10mlのＨ₂Ｏで洗浄した。1mlの0.1M NiSO₄を加えてゲルを再懸濁させ5分振盪することでゲルにNiSO₄を結合させた。10mlの精製水で洗浄後、Start buffer（ 300mMNaCl, 10mM imidazole, 20mMTris-HCl; pH8.0）で洗うことでゲルを調整した。ゲルが入ったカラムに2-3-1で調整した抗原溶液を加え、室温で30分攪拌することで抗原をカラムに結合させた。カラムの下部のキャップを開け、ゲルに結合しなかった物質を溶出させ、チューブに回収した。その後、50mlのStart Bufferを加えゲルを洗浄した。洗浄を終えたゲルに50mM, 100mM, 200mM, 300mM imidazoleを含む溶液Aをそれぞれ順次10ml加えることでカラムに結合した抗原を溶出した。最後に10mlの50mM EDTAを加えることでNiSO₄を溶出し、カラムに結合する可能性のあるもの全てを溶出させた。抗原を含む画分を透析チューブ（20/32, エーディア（株））に入れ、Ｈ₂Ｏで1時間処理を2回、次に結合buffer（500mMNaCl, 100mM NaHCO₃; pH8.3）で1時間処理した後、新しい結合bufferにかえて1晩処理した。これを濃縮デバイス（Amicon® Ultra-4 centrifugal Filters: Merck Millipore）を用いて約1.5mlまで濃縮した。

2-3-3　CNBr-activated Sepharose 4Bを用いた抗原カラムの作成

0.29gの CNBr-activated Sepharose 4B（Pharmacia Biotech）を秤量し、1mM HClで洗浄した。余分な1mM HClを除いた後、これに2-3-2で調整した抗原液を加え、室温で1時間処理することで抗原をカラムに結合させた。カラムを結合bufferで洗浄後、カラムに0.1 M Tris- HCl; pH 8.0を加え、2時間静置することで、未反応のカラム部分をブロッキングした。この処理を終えた後、カラムを0.5M NaCl/ 0.1M sodium acetate buffer; pH4.0での洗浄と、0.5M NaCl/ 0.1M Tris-HCl; pH8.0での洗浄を交互に3回繰り返した後、カラムをTBS（150mM NaCl, 20mM Tris-HCl; pH7.4）で平衡化した。

2-3-4　抗XTdrd6抗体の精製

　抗XTdrd6抗血清（Hiyoshi et al., 2005）4mlを55℃で30分間処理することで補体系を失活させた。これを2-3-3で作製した抗原カラムに加え室温で30分間反応させた。反応後、0.5M NaClを含むTBS 20mlでカラムを洗浄し、さらにTBSで十分に洗浄した。最後に5mlのＨ₂Ｏで洗浄した後、100ｍＭ glycine/HCl（pH2.5）で抗原に結合した抗体を溶出した。1ml溶出する毎に50μlの１M Trisを加えて溶出液を中和化しておいた。8ml溶出したところで透析チューブに入れ、TBSで2時間透析した後、新しいTBSにかえ一晩透析した。これを濃縮デバイスを用いて約250μlまで濃縮した。

2-3-5　タンパク質の定量

精製した抗原と抗体の定量はBCA protein Assay kit（Pierce）を用いて行った。

2-4　 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

10％のポリアクリルアミド溶液（9.69% w/v acrylamide, 0.27% w/v N,N’-methylenebisacrylamide, 0.1% w/v SDS, 0.055% v/v TEMED, 0.077% w/v APS, 375mM Tris-HCl; pH8.8）をゲル板（厚さ 1mm×幅 10.5cm×高さ 10cm）に流し込み、isopropyl alcoholを重層してゲル化させることにより分離ゲルを作成した。isopropyl alcoholを除去し、分離ゲルの上に濃縮ゲル溶液（4.38% w/v acrylamide, 0.12% w/v N,N’-methylenebisacrylamide, 0.1% w/v SDS, 0.1% v/v TEMED, 0.06% w/v APS, 125mM Tris-HCl:pH6.8）を流し込み、コームを挿入してゲル化させた。ゲル板を電気泳動槽（AE-6530M: ATTO）にセットし、泳動用バッファー（25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% w/v SDS）で泳動槽を満たした。泳動するサンプルは、等量の×2 sample buffer（47% SDS, 20% glycerol, 10%2ME, 0.002% BPB, 125mM Tris-HCl; pH6.8）と混合し、5分間湯煎した。これをコームで形成したウェルに流し込み、120Vの定電圧で泳動した。この時、分子量マーカー（Precision Plus Protein Standards: BIO-RAD）も一緒に泳動した。BPBがゲルの下端から約0.5㎝まで達した時点で泳動を終了し、ゲルをゲル板から外し、CBB染色液（3mM CBB R-250, 50% methanol, 10% acetic acid）で15分間染色し、その後脱色液（10% methanol, 10% acetic acid）で余分な染色液を除去した。

2-5　ウェスタンブロット

2-5-1　PVDF膜への転写

PVDF膜と chromatography paper（3MM CHR: GE Healthcare）6枚をゲルと同じサイズに切った。PVDF膜はmethanolに浸し、純水で軽く洗った後、Anode buffer Ⅱ(25mM Tris, 10% v/v methanol)で平衡化を行った。電気泳動終了後、ゲルをゲル板より外した。転写板（日本エイド―）にAnode bufferⅠ(300mM Tris, 10% v/v methanol)に浸したchromatography paper 2枚、Anode buffer Ⅱに浸したchromatography paper1枚、PVDF膜、ゲル、Cathode buffer（25mM Tris, 40mM glycine, 10% v/v methanol）に浸したchromatography paper3枚の順に重ね、1.2mA/cm²の定電流で1時間転写した。転写終了後、PVDF膜をmethanolに浸し、その後37℃で15分乾燥させた。

2-5-2　抗体の検出

乾燥したPVDF膜をDIGⅡ（1.5% blocking reagent[Roche] in DIGⅠ（150mM NaCl, 100mM maleic acid; pH7.5））で室温1時間処理した後DIGⅡで1000倍希釈したAnti rabbit IgG AP標識（Invitrogen）で室温・30分反応させた。反応終了後、DIGⅠでPVDF膜を5分間×3回洗浄した。処理済みのPVDF膜を発色用バッファー（96mM NaCl, 50mM MgCl₂, 96mM Tris-HCl: pH9.5）で処理した後に、NBT/BCIP（Roche）を発色用バッファーで50倍希釈した液に浸すことでシグナルを検出した。

2-6　　免疫組織化学

2-6-1　精巣の固定・脱水・包埋

精巣を摘出後、4% paraformaldehyde in 70% PBS（136.9mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄）に移し、室温で2～3時間固定した。固定後、組織を70％ ethanolに移し30分間放置した。その後、80%・90%・95%・100%・100% ethanol中でそれぞれ30分間処理することで完全に脱水した。脱水後、組織を安息香酸メチルに入れた。組織が沈下した後、さらに新しい安息香酸メチルに移して20分間放置した。その後、lemosol（和光純薬）に移し、20分間放置した。次に、70℃で加温融解したparaffinに30分間入れた。新しいparaffinに移し30分間処理することをさらに２回行った後、室温でparaffinを固めることで組織の包埋を行った。

2-6-2　切片の前処理

包埋した組織を7μmの厚さに切り、50℃に加温した水上に切片を浮かべることで伸展させたのち、MAS-coated slide glass（MATSUNAMI）に張り付けた。その後、スライドガラスを37℃で一晩放置することで切片を乾燥させた。乾燥後、スライドガラスをxylene中に移し、10分間×２回放置することで脱paraffinを行った。脱paraffin後、100%・100%。90%・70% ethanolに順次3分間ずつ浸すことにより加水を行った。その後、水道水の入った容器中に移し、15分間以上放置することで完全に加水した。加水後、スライドガラスを抗原賦活化用buffer（10mM trisodium citrate: pH6.0）に移して120℃で5分間処理することで抗原を賦活化した。

2-6-3　抗体反応

抗原不活化処理を行った切片をDIGⅠbuffer中に移し、5分間洗浄した。洗浄後、liquid blocker（大道産業）で組織の周りをマーキングして、20μlのDIGⅡbuffer を試料の上に滴下して室温、湿室中で1時間放置することでblockingを行った。Blocking終了後、スライドガラス状に残っているDIGⅡbufferを取り除き、2-3-4で精製したαXTdrd6 antibodyをDIGⅡで1000倍希釈したものを40μl滴下して4℃、湿室中で一晩処理した。反応終了後、スライドガラスをDIGⅠbufferで10分間×3回洗浄することで過剰な抗体を除いた。その後、DIGⅡbufferで100希釈したFITC結合抗ウサギ抗体（Cappel）を20μl滴下して室温、湿室中で30分間処理した。反応終了後、スライドガラスをDIGⅠbufferで10分間×3回洗浄することで過剰な抗体を除き、カバーガラスをかけて、蛍光顕微鏡（BX53［OLYMPUS］）で観察した。

2-6-4　hematoxylene・eosin染色

蛍光観察を終えた切片をhematoxylin（Merck）で5分間染色した後、流水に1分間浸すことで余分な染色液を洗い流した。次に0.5% eosin（Schmid GmbH）で1分間染色し、流水に1分間浸すことで余分な染色液を洗い流した後、カバーガラスをかけて顕微鏡（BX53）で観察した。

2-7　32細胞胚植物極割球への抗体顕微注射

2-7-1　ガラスマイクロピペットの作成

顕微注射用のガラスマイクロピペットは、30μl用のマイクロキャピラリー（フナコシ株式会社）をガラス電極作成機（PN-3; NARISHIGE）で引き延ばした後、この注射針の先端部分を研磨機（EG-40; NARISHIGE）を用いて約20°の角度で研磨し針先の直径が10μmになるように調整した。その後、Ｈ₂Ｏ、ethanolで順次洗浄した。

2-7-2　胚の調整

アフリカツメガエルの成体雌にhuman chorionic gonadotrophin（あすか製薬）500単位を注射して排卵を誘導し、16℃で飼育し翌日卵を絞り出した。一方、成体雄から精巣を摘出し、これを1×MMR（100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgSO₄・H₂O,2mM CaCl₂, 5mM Tris-HCl; pH7.8）中で細断することにより精子懸濁液を調整した。絞り出した卵に精子懸濁液をかけて5分後に1/10 MMRを加えて受精させた。1/10 MMRを除いた後、２％ cysteine（pH 7.9~8.2）で処理することでゼリー層を除いた。これを1/10MMRで4回洗い32細胞期胚になるまで23℃で培養した。胚の発生段階は、アフリカツメガエル標準発生段階表（Nieuwkoop and Faber,1967）に従った。

2-7-3　マイクロインジェクション

25mg/mlのFDL（Invitrogen） 1μlと2-3-4で精製した抗XTdrd6抗体（約1μg/μl）24μlを混合して抗体液とした。また、対照として、25mg/ml FDL 1μlとTBS 24μlを混合したコントロール溶液を作製した。2-7-1で作製したガラスマイクロピペットにシリコンオイルを充填した後、インジェクター（Nanoject I; Drummond）に装着し、抗体液もしくはコントロール溶液をガラスマイクロピペットに吸引した。１×MMRに溶解したFicoll溶液（6% Ficoll［SIGMA］ in 0.4×MMR）が入ったシャーレの底にメッシュ（1mm×1mm）を置き、その上に試料を植物極側が上になるように並べた。インジェクターを用いてガラスマイクロピペットを植物極の割球に刺し、抗体液もしくはコントロール溶液を注入した。この時、植物極の4つの割球すべてに4.6nl注入した。3時間後、Ficoll溶液と等量のＨ₂Ｏを加えて一晩培養した。次の日、胚を1/10 ＭＭＲに移し、23℃でSt.49まで育てた。

第3章　結果

3-1　抗XTdrd6抗体の精製

生殖質に多く蓄積しているXTdrd6の働きを阻害するための抗XTdrd6抗体をアフィニティー精製するため、抗原を調整した。この抗体は、XTdrd6の5番目と6番目のtudorドメインを含む部分を抗原として作製されている（Hiyoshi et al., 2005）。そこでこの抗原を発現するplasmidを発現用大腸菌BL21株に導入してIPTGで誘導することにより発現させた。IPTGでの発現誘導前（図1、NO IPTG）とIPTGでの誘導後2時間たった金内容物（図1、start）を比較すると、100kDa付近にあるバンドが明らかに誘導後濃くなっていた。そこで、集菌して超音波処理で菌を破壊したところ、100kDa付近のタンパク質はすべて遠心上清に回収された（図1、sonication, sup）。この結果から、このタンパク質は、菌の中で可溶化していることが分かった。chelatingカラムを用いて精製したところ、100kDa付近のタンパク質は100mMと200mMのimidazoleで溶出されてきた（図1）。そこで、この画分を用いて抗原カラムを作製し、抗XTdrd6抗血清から抗XTdrd6抗体を精製した。精製抗体を非還元状態で電気泳動したところ、約150kDaのところに1本のバンドが確認できた（図２、amido black）。ウェスタンブロットで確認したところ、このタンパク質はウサギ抗体であることが分かった（図2、western blot）。この抗体が抗XTdrd6抗体であるか確認するために精巣切片をこの抗体で免疫染色したところ、精細胞や成熟精子を除く精子形成細胞が特異的に染色された（図3）。この結果から、今回精製した抗体はXTdrd6を特異的に認識して結合するものと判断した。

3-2　植物極割球への抗体の顕微注入

　まず、抗体を注入した細胞を追跡できるように、蛍光物質であるFDLを同時に注入することにした。植物極側のひとつの割球に4.6ng, 57.5ng, 115ngのFDLを顕微注射したところ、57.5ngと115ngを注入した場合、細胞分裂が阻害されていた（図4）。このことから、FDLの濃度は細胞分裂に影響を及ぼすと判断した。4.6ngでは影響が出ていなかったことから、今回の実験では1mg/mlのFDLを用いて実験を行った。コントロール溶液を注入していた場合、St.49まで正常に発生した個体数は37個体中26個体（70.3％）であった（表1）。それに対し、抗体溶液を注入した場合では40個体中20個体の（50.0％）が正常に発生しておりコントロール溶液の場合に比べ正常発生率が悪くなっていった（表１）。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（図6、Gut）はコントロール溶液を注入した個体の腸形成（図5、Gut）同様に正常であった。腸形成が正常で正常に発生しているSt.49の生殖巣の部分を蛍光顕微鏡で観察したところ、コントロール溶液を注入した個体では数多くの蛍光を発する細胞が観察された（図5、Gonad＆Kidney）。切片を作製して観察したところ、この光る細胞は生殖細胞であった（図7）。抗体溶液を注入し正常に発生したSt.49のオタマジャクシを観察したところ、コントロール溶液を注入したものと同様に光る細胞が観察された（図6、Gonad＆Kidney、FITC）。しかし、その数は調べたほとんどの個体において非常に少なかった（表2）。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。

第4章　考察

　XTdrd6タンパク質は、卵母細胞や卵割期胚においてmRNPの構成因子として母性mRNAの翻訳制御に関わっていることがわかっている（Mostata et al., 2009、Ohgami et al., 2012）。XTdrd6タンパク質は、卵割期胚の生殖質に非常に多く蓄積している（Mostata et al., 2009）。生殖質には*XDazl* mRNAなど始原生殖細胞分化に重要なタンパク質をコードする母性mRNAが多く存在している（Houston and King,2000）。生殖質に局在するXTdrd6タンパク質もここに局在している母性mRNAの翻訳制御を通して始原生殖細胞、ひいては生殖細胞分化に関わっているのではないかと予想し、抗XTdrd6抗体を用いて機能阻害したときの影響について調べた。Ikenishiら（1997）の方法に従い、32細胞期胚の植物極に位置する4つの割球すべてにFDLとともに抗体を注入したところ、Hiyoshiら（2005）が観察した卵割の停止は起こらなかったが、抗体を注入していないコントロールと比較して明らかに奇形個体の出現が多かった。XTdrd6タンパク質は卵割期に働く母性mRNAの翻訳制御にも働くと考えられることから、これら奇形の出現は生殖質の母性ｍRNAのみならず、植物極割球由来で体細胞への分化に働くmRNAの翻訳制御に影響したのではないかと考えている。一方、外見上正常に発生したSt.49のオタマジャクシを解剖して観察したところ、抗体を注入した植物極割球由来の腸も正常に形成しており、同時に注入したFDLの効果で緑色の蛍光を発していた。この個体においては、注入した抗体の影響が、内胚葉系の体細胞に分化する運命を持った細胞には出なかったと考えられる。同じ割球に由来する生殖質を受け取った始原生殖細胞は、周りの内胚葉組織の間を移動し、背側の体腔壁に形成される中胚葉性の生殖巣原基に入り、生殖細胞へと分化していく。抗体を注入した個体を観察したところ、注入していない個体群と比べて明らかに生殖巣に存在する生殖細胞数が減少していた。この結果から、明らかに注入した抗体の作用により生殖細胞形成に影響が出たと考えられる。上述したように、生殖質には始原生殖細胞分化に重要な働きをするタンパク質をコードする母性mRNAが存在する。卵母細胞や卵割期胚におけるXTdrd6タンパク質の働きが翻訳制御であることを考慮すると、生殖質に存在するXTdrd6タンパク質もここに局在する母性mRNAの翻訳制御を通して、生殖細胞分化に寄与しているのではないかと考えている。今後、そのことを証明するためにも、生殖質に存在する母性mRNAの翻訳を測定するシステムを構築して、抗体による機能阻害の影響を検証していく必要がある。

第5章　参考文献

Hiyoshi, M., Nakajo, N., Abe, S-I. and Takamune, K (2005) Involvement of Xtr (*Xenopus* tudor repeat) in microtubule assembly around nucleus and karyokinesis during cleavage in　*Xenopus laevis*. Dev. Growth Differ. 47, 109–117.

Houston, DW. and King, ML. (2000) A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. Development 127, 447-456.

Ikema, Y., Hiyoshi, M., Daiyasu, H., Toh, H., Mori, M. and Takamune, K. (2002) Two novel genes expressed in *Xenopus* germ line: Characteristic features of putative protein structures, their gene expression profiles and their possible roles in gametogenesis and embryogenesis. Mol. Reprod. Dev. 62, 421–430

Ikenishi, K. and Tanaka, T-S., (1997) Involvement of the protein of *Xenopus* vasa homolog (*Xenopus* vasa-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. Dev Growth Differ. 1997 39:625-633.

Mostafa, M.G., Sugimoto, T., Hiyoshi, M., Kawasaki, H., Kubo, H., Matsumoto, K., Abe, S-I. and Takamune, K. (2009) Xtr, a plural tudor domain-containing protein, coexists with FRGY2 both in cytoplasmic mRNP particle and germ plasmin *Xenopus* embryo: Its possible role in translational regulation of maternal mRNAs. Dev. Growth Differ. 51, 595–605.

Nishiumi, F., Komiya, T. and Ikenishi, K. (2005) The mode and molecular mechanisms of the migration of presumptive PGC in the endoderm cell mass of *Xenopus* embryos. Dev. Growth Differ. 47, 37–48

Ohgami, H., Hiyoshi, M., Mostafa, M.G., Kubo, H., Abe, S-I. and Takamune, K. (2012) Xtr, a plural tudor domain-containing protein, is involved in the translational regulation of maternal mRNA during oocyte maturation in *Xenopus laevis*. Dev. Growth Differ. 54, 660–671.

Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1967) Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publishing Co.

杉本哲司　(2009) アフリカツメガエル（*Xenopus leavis*）の生殖質及び始原生殖細胞に存在するXtr（*Xenopus* tudor repeat）タンパク質の解析

熊本大学大学院自然科学研究科理学専攻生命科学コース修士論文

第6章　図版の説明

図１：**XTdrd6の5番目と6番目のtudorドメインを含むペプチドを発現する大腸菌からのペプチド精製過程**

大腸菌にIPTGを加えて発現を誘導する直前の菌（No IPTG）、発現誘導して2時間後の菌（start）、超音波処理した菌（sonication）の遠心上清（sup）、遠心沈殿物（ppt）、遠心上清をchelatingカラムに吸着させたときの素通り画分（FT）、50mM（50）、100mM（100）、200mM（200）、300mM（300）imidazole、続いて50mM EDTA（EDTA）で溶出した画分を泳動した10％SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像。左の数字は、分子量を示している。

**図2：抗原カラムを用いて精製した抗体の確認**

抗原カラムを用いてアフィニティー精製した抗体約1μgを非還元条件下で10％SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、PVDF膜に転写した。1つのレーンはamido blackで染色し（amido black）、もう1つのレーンは抗ウサギIgG抗体で免疫染色した（Western blot）。左の数字は、分子量を示している。

**図３：精製抗体を用いた精巣の免疫染色**

精巣の切片を精製抗体で免疫染色（affinity purified antibody）した後、ヘマトキシリン/エオシンで染色した（hematoxylin/eosin）。MS: 成熟精子、PC: 第一精母細胞、PG: 第一精原細胞、SG: 第二精原細胞

**図4：FDLの濃度と細胞分裂の関係**

32細胞期の植物極側のひとつの細胞に4.6ng, 57.5ng, 115ngの量のFDLを顕微注射し、細胞分裂が起こった後観察した。矢印は蛍光を発している細胞を示している。57.5ng, 115ng 注入した割球は分裂していないが、4.6ng 注入した割球由来の細胞は少なくとも3つ確認できた。

**図5：コントロール溶液を植物極割球に注入して正常に発生したSt.49のオタマジャクシの腸（Gut）と生殖腺・腎臓（Gonad＆Kidney）部分の明視野（Bright Field）像と蛍光（FITC）像**

矢頭は生殖細胞をあらわしている。バーは、Gutが0.5㎜、Gonad＆Kidneyが0.2㎜を示す。

**図6：抗体溶液を植物極割球に注入して正常に発生したSt.49のオタマジャクシの腸（Gut）と生殖腺・腎臓（Gonad＆Kidney）部分の明視野（Bright Field）像と蛍光（FITC）像**

矢頭は生殖細胞をあらわしている。バーはGutが0.5㎜、Gonad＆Kidneyが0.2㎜を示す。

**図7：生殖巣と腎臓の領域で蛍光を発している細胞の組織切片像**

コントロール溶液を注入して正常に発生したSt.49の生殖巣と腎臓部分を切り出し、切片を作製して蛍光観察（FITC）した後、ヘマトキシリン/エオシン（hematoxylin/eosin）で染色した。FITCによる蛍光を発している細胞は生殖細胞であった（矢印）。バーは50μmを示す。