Xtr(Xenopus tudor repeat)の核周りの微小管集合と切断時の核運動への関与に関する研究

１我々はこれまでに、新規遺伝子Xenopus tudor repeat (Xtr)の転写産物が生殖細胞や初期胚細胞にのみ発生することや、推定Xtrがタンパク質間の相互作用に関与すると考えられる複数のtudorドメインを含んでいることを明らかにした。Xtrの役割を理解するために、Xtrのtudorドメインを含むポリペプチドを抗原とする抗体を作製し、Xtrの分布と機能を調べた。免疫沈降法／ウェスタンブロット法および免疫組織化学的分析により、Xtrは精子形成期にその量のプロファイルが若干異なることを除いて、mRNAと同様に存在することが示された。XtrのmRNAは第二次精母細胞後期に大量に存在するにもかかわらず、Xtrの量はこの段階までは低レベルに保たれ、減数分裂期に入ると増加することがわかった。活性化した卵に抗Xtr抗体を注射してXtrの機能を失わせると、核の周りの微小管の集合と原始期以降の核運動の進行が共に阻害されたが、H1キナーゼ活性の振動は起こらなかった。これらの結果から、少なくとも初期胚細胞の核運動は、Xtrが関与する独自のメカニズムで制御されていることが示唆された。

２ほとんどの有性生殖生物では、胚発生初期に対角線上に分化した始原生殖細胞（PGC）から配偶子が派生する。線虫、昆虫、魚類、無尾両生類などの一部の動物では、PGCsは、卵母細胞に非対称に局在する特定の細胞質である生殖細胞質を受け継ぐことで特定されると考えられている（Mahowald 1962; Smith 1966; Illmensee & Mahowald 1974; Okada et al.） PGCは体組織を移動した後、発達中の生殖腺に到達し、そこで最終的に精子または卵子となる。雄性生殖細胞と雌性生殖細胞の分化過程の特徴は明らかに異なっているが、DNAの完全な長さを保ち、有糸分裂期から減数分裂期に移行し、その後2回の減数分裂を経ることは、世代を経てもDNAや染色体の増殖が短くなることなく、受精卵の発生を成功させるための共通の特徴である。

３これまでに、Xenopus laevisの有糸分裂期から減数分裂期への移行の分子メカニズムを理解する手がかりを得ることを目的として、後期第二次精母細胞と初代精母細胞のミクロソーム画分に含まれるタンパク質を比較することで、新たに合成されるタンパク質と、減数分裂期に入ってから量が増加する3つのタンパク質を同定した。また、同定された4つのタンパク質を抗原として作製したポリクローナル抗体を用いて、精巣cDNAライブラリーから2つのcDNAクローンを免疫スクリーニングした（Ikema et al. 2002). 2つのcDNAのうちの1つ（Xtr）をプローブとして用いてmRNAの分布を解析したところ、XtrのmRNAは、少なくとも尾芽期までは生殖細胞や初期胚に存在するが、成体の体細胞には存在しないことがわかった。興味深いことに、Xenopusでは有糸分裂期から減数分裂期への転換能力を獲得したばかりと考えられる後期第二次精原細胞では、Xtr mRNAの量が明らかに増加していた（Takamune et al.2001）。したがって、Xtr遺伝子の発現上昇は、有糸分裂期から減数分裂期への転換能力の獲得と相関していると考えられる。また、Xtr mRNAの発現プロファイルは、この翻訳産物の機能によって、生殖細胞や初期胚細胞が、成体の体細胞にはない何らかの特異的な能力を獲得しているのではないかという期待を抱かせるものである。

４推定Xtrは複数のtudorドメインを含んでおり、これはDrosophila melanogaster（キイロショウジョウバエ）のTudorのtudorドメインと相同であった(Golumbeski et al. 1991)。tudorは、ショウジョウバエの腹部の分節化と極細胞（生殖細胞）の決定の両方に必要とされる後方グループ遺伝子の一つである（Boswell & Mahowald 1985）。Tudorは10個のtudorドメイン以外のドメインを持たないようで、Tudorの重要な機能はこれらのtudorドメインに帰属すると考えられている。その機能の分子的実体は明らかにされていないが、Amikuraら（2001）は、Tudorが極形質（生殖質）のミトコンドリアと極性顆粒の境界でミトコンドリアの大型リボソームRNA（mtrRNA）と共局在することを示し、Tudorがミトコンドリアから極性顆粒へのmtrRNAの輸送を媒介していると仮定した。

５チューダードメインは、様々な生物の様々な組織で発現する他のいくつかのタンパク質にも見られる(Ponting 1997)。ほとんどのtudorドメインを持つタンパク質において、その機能がtudorドメインの作用に起因するかどうかは解明されていないが、我々が知る限り、tudorドメインがその機能に重要であることが証明されているタンパク質が2つある。Hiroseら（2000）は、ラットのCdc2関連キナーゼであるPCTAIRE 2に結合する新規タンパク質（Trap）を同定し、このタンパク質に5つのチューダー様ドメイン（TD1-5）が存在することを示した。また、TrapとPCTAIRE 2の結合には、TD4とTD5が必要かつ十分であることを、酵母ツーハイブリッド法を用いて示した。もう一つのタンパク質は、ヒトのSurvival of Motor Neuron (SMN)タンパク質である。このタンパク質のtudorドメインに変異があると、tudorドメインがスプライソソームのウリジンに富む小核リボ核タンパク質複合体と相互作用する能力が著しく低下し、脊髄性筋萎縮症を引き起こす(Liu et al. 1997; Bühler et al. 1999; Selenko et al. 2001)。これらの結果は、タンパク質-タンパク質間の相互作用を介して、それらの機能におけるtudorドメインの重要性を明確に示している。本研究では、複数のチュードルドメインを持つXtrの役割を解明するために、チュードルドメインを含むポリペプチドを抗原とする抗Xtr抗体を作製し、この抗体を卵および胚にマイクロインジェクションすることで、Xtrの機能を特異的に阻害することに成功した。Xtrは、生殖細胞や初期胚細胞に、XtrのmRNAとはわずかに異なる量で存在していた。後期精母細胞ではXtrのmRNAが大量に存在するにもかかわらず、Xtrは少量しか存在せず、精母細胞が減数分裂期に入るとその量は増加しました。卵や胚に抗Xtr抗体を注入してXtrの機能を特異的に阻害すると、Cdc2活性が正常に振動しているにもかかわらず、核の周りに微小管が正常に組織化されておらず、減数分裂期に核の変化が停止することがわかった。Xtrの分布と抗Xtr抗体による阻害効果から、今回の報告では、生殖細胞や初期胚細胞に特異的なメカニズムが、それらの細胞の核分裂の進行に関与している可能性を提案した。

ダイアグラム

自動的に生成された説明

６卵母細胞および胚の調製

Xenopus laevisの卵母細胞および胚は、前述の方法で調製し（Ikema et al.2002）、それぞれ50% Leivovitz-15および33% Marc's Modified Ringers (MMR)で培養した。卵母細胞および胚のステージは、それぞれDumont (1972)およびNieuwkoop & Faber (1967)に従って決定した。

７組換えプラスミドの構築とin vitro転写

オープンリーディングフレーム（ORF）のみからなるXtr cDNAは、以下のようにして得た。Xtr ORFの5'-及び3'-エンド断片は、SmaIサイトを有する5'プライマー（5'-GGCCCGGATGCGCCCGCCCTGTG-3'）、3'プライマー（5'-CGGCATCACAGAAACTGT-3'）及びXtr genomic DNA (Accession No.を用いて、35サイクルのPCR（94℃ 30秒、 50℃30 秒、 72℃ 1分）で増幅させた。AB191036）を5'末端断片の鋳型とし、5'プライマー（5'-CACACCGCTTCTTGAGGG-3'）、XhoIサイトを有する3'プライマー（5'-CCTCGAGCTACGCTGGGCTG-3'）、Xtr cDNA（Ikemaら2002）を3'末端断片の鋳型として使用した。5'末端断片をSmaIとSalIで消化した後、この断片をpBluescript SKII+ ベクター(Stratagene, La Jolla, CA, USA) の同じ酵素部位に挿入し、続いてXtr cDNAのEcoRV-XhoI消化の3´断片とSalI-EcoRV断片をこのコンストラクトの同じ酵素部位に挿入した。5′末端と3′末端にそれぞれXbaI部位とSmaI部位を持つ、連続した3つのMycエピトープをコードするcDNAをpT7G（UKII+）ベクターの同じ酵素部位に挿入し（Okamoto et al.2002）、次にXtr ORFのSmaI-XhoIフラグメントをpT7G（UKII+）ベクターのそれぞれのcDNAの3′下流に挿入した。これらのコンストラクトをNotIで単独消化し、T7Cap-Scribe (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて5'-capped mRNAにin vitroで転写させた。

８抗体作製

BamHIサイトを持つ5'プライマー（5'-CCGGATCCCAGAATTCGAATCCACCG-3'）を用いて、PCR（95℃×30秒、50℃×30秒、72℃×1分）を40サイクル行って増幅したDNA断片を用いた。XhoIサイトを持つ3'プライマー（5'-GGCTCGAGGCAGCTTTGGTCCGTGGC-3'）を用いて、鋳型となるXtr cDNAをBamHIとXhoIの両方で消化し、pET21aベクター（Novagen, Madison, WI, USA）の同じ酵素サイトに挿入した。このヘキサヒスチジン融合タンパク質を大腸菌BL21で発現させ，キレートセファロースファストフロー（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA）を用いて精製し，ウサギの抗Xtr抗体を作製するための抗原として用いた。抗Xtr抗体と正常ウサギ免疫グロブリン（NRI）は、それぞれ抗原とプロテインA-セファロース（Amersham Biotech）を結合させたCNBr活性化セファロース4B（Amersham Biotech）を用いてアフィニティ（親和性）精製し、緩衝液（88 mm NaCl, 1 mm KCl, 15 mm Tris-HCl; pH 7.5）に対して透析し、標準的な方法で5 mg/mLまで濃縮した。

９マイクロインジェクション

6% Ficollを含む50% Leivovitz-15に入れた完全に成長した卵子にmRNA（10 ng/23 nL）を注入した。Murray (1991)の方法で調製した脱膜精子核（約50核）を含む、または含まないアフィニティ精製抗体を、33%MMRに溶解した6%Ficollに入れた卵（250ng/50nL）または2細胞期胚の胚盤胞（115ng/23nL）に注入した。

１０免疫沈降とウェスタンブロッティング

成体組織、卵母細胞、胚をホモジナイズし、HB（1 mm エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、150 mm NaCl、0. 1% NP-40, 1 mm phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 1 µg/mL N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), 1 µg/mL N-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone (TLCK), 10 mm Tris-HCl; pH 7.5) でホモジナイズし，16 000 g, 10 分間で遠心分離した。上澄み液に含まれる200µgのタンパク質の量を、あらかじめ5µgの抗Xtr抗体を結合させた20µLのプロテインAセファロースと4℃で1時間インキュベートした。結合タンパク質をLaemmli's sample buffer（Laemmli 1970）で煮沸してゲルから溶出させ、溶出液をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）に供して、抗Xtr抗体（5μg/mL）、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体（Sigma Chemical, St Louis, MO, USA; 希釈率1: 500）、免疫反応を可視化するための試薬としてニトロブルーテトラゾリウム（NBT）／5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト（BCIP）溶液（ロシュ社）を用いた。Myc-Xtr mRNAを注入し、18℃で12時間培養した卵母細胞において、上澄み液中の4mgのタンパク質を上記のように免疫沈降させ、溶出液を抗cMycモノクローナル抗体（Sigma；希釈率1: 100）およびアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG+A+M（Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA; 希釈率1:500）を用いてウェスタンブロットを行い、その後、上記のように免疫反応を検出した。

１１免疫組織化学

免疫組織化学的観察は、Wakabayashi & Shinagawa (2001)の方法に修正を加えて行った。厚さ10µmの切片を，抗Xtr抗体（500µg/mL）または抗α-tubulin抗体（clone DM1A; NeoMarker, Fremont, CA, USA; 1:50に希釈）でDIG II（DIG I（150 mm NaCl, 100 mm Maleic acid; pH 7. 5））で1時間処理した後、それらをDIG II中のフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識抗ウサギIgG抗体（ICN Pharmaceutical, Costa Mesa, CA, USA; 1:50に希釈）またはAlexa 568標識抗マウスIgG抗体（NeoMarker; 1:50）で1時間処理した。一部の切片はHoechst（10μg/mL）で15分間染色し，DIG Iで一晩洗浄した。蛍光観察はOlympus AX70顕微鏡（Olympus, Tokyo, Japan）を用いて行った。精巣の細胞ステージを識別するために，切片をヘマトキシリン/エオジンで染色した。

１２ヒストンH1キナーゼアッセイ

ヒストンH1キナーゼアッセイは、Furunoら（1994）の方法に従って実施した。簡単に言うと、活性化卵を15μLの抽出バッファーでホモジナイズし、短時間で遠心分離した。上澄み液5μLをヒストンH1キナーゼアッセイに供した。

１３Xtrタンパク質の免疫検出

XtrのcDNAの構造を示した前回の報告では、cDNAのフレーム内の最初のATGコドンが翻訳開始コドンであると仮定し、Xtrは1905個のアミノ酸残基からなり、計算上の分子量は213 656 Daで、4つの完全なおよび1つの部分的なチュードルドメインを含むと予測した（図1A、上段；Ikema et al.） この構造情報をもとに、2つのチューダードメインを含むXtr-ヘキサヒスチジン融合タンパク質を抗原として、抗Xtrポリクローナル抗体を作製した（図1A、上段の実線で示した部分）。免疫沈降法とウエスタンブロット法により、この抗体が2つのタンパク質と反応することが明らかになった。この2つのタンパク質は、精巣と卵巣では270kDaで密接に移動したが、肝臓では移動しなかった（図1B、レーンT、O、L）。これらのタンパク質の分子サイズは、Xtr cDNAの塩基配列から推定されるXtrの分子サイズよりも明らかに大きかった。このように、前回の報告で推定されたXtrと抗体で認識されたタンパク質との間で分子サイズが一致しないのは、270kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列とXtr遺伝子の塩基配列（Accession No.AB191036）の両方を決定した結果、前回の報告では開始コドンを誤って推定していたことが判明した。得られた推定Xtrは、2466個のアミノ酸残基からなり、計算上の分子量は276 245 Daで、本研究で作製した抗体が認識するタンパク質のサイズと一致し、6つの完全なチューダードメインと1つの部分的なチューダードメインを含んでいた（図1A、下段）。この抗体によって認識された270kDaのタンパク質は、Xtr遺伝子にコードされたタンパク質と同一であることが確認された。この270kDaのタンパク質は、Myc（50アミノ酸残基）タグ付きのXtrタンパク質とSDS-PAGEで非常によく似た移動度を示した。また、Xtr融合タンパク質を添加すると、270kDaタンパク質に対する抗体反応が阻害されることからも、同様の確認が行われた（データは示されていない）。これらの結果は、今回作製した抗体が生来のXtrタンパク質と特異的に反応することを明確に示している。抗Xtr抗体による2つのタンパク質の検出は、Xtr mRNAの欠失型（開始コドンから7068-7160の部分を欠失）の存在に起因すると考えられ、小さい方のタンパク質はこの欠失型Xtr mRNAに由来すると考えられた。

Figure1

(A) 既報のcDNA（Ikema et al. 2002；上段）とXtrゲノム（Accession No. 斜線部、網掛け部、閉じた部分は、それぞれチューダードメインの部分配列、完全配列、繰り返し配列を示す。(B）精巣（T）、卵巣（O）、肝臓（L）および卵母細胞にMyc-Xtr mRNAを注入した（I）および注入していない（N）から抽出したサンプルのウェスタンブロット。これらの抽出物を抗Xtr抗体で免疫沈降させ、6%ゲルでドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）し、メンブランに電気泳動した後、ブロットを抗Xtr抗体（T、O、L）または抗cMyc抗体（I、N）処理した。二重矢印は、免疫沈降に使用したウサギ抗体の重鎖を示す。

１４免疫沈降法および抗Xtr抗体を用いたウェスタンブロット法により、卵形成および胚形成におけるXtrの出現を観察したところ、I期の卵母細胞にかなりの量のXtrが見られ、この量は尾芽期まで一定に保たれ、それ以降は減少した（図2A）。このXtrの出現プロファイルは、XtrのmRNAの出現プロファイルと一致していた（参考：Ikema et al.） 一方、精巣におけるXtr mRNAとXtrの出現プロファイルにはいくつかの違いがあった。Xtr mRNAは、丸い精子の段階以降を除くすべての段階の精原細胞に存在し、その量は後期の精原細胞で明らかに増加していた（Ikema et al.2002）。Xtrも丸い精母細胞と後期の細胞を除くすべての精子形成細胞に存在するが（図2B）、その量は精子形成の過程で変化した。初代の精原細胞はXtrを大量に含んでいた（図2B；PG、矢印）。それらの細胞が初期第二次精母細胞に分化した後、その量は減少し、後期第二次精母細胞期まで低レベルに保たれた（図2B；SG、二重矢印）。減数分裂期に入った直後から、Xtrの量は一時精子期まで増加し（図2B；LZとPa）、二次精子期ではわずかに減少した（図2B；SC）。これらの結果から、Xtrのタンパク質の安定性や翻訳効率は、精子形成の過程で変化していると考えられた。特に、減数分裂期に入ってからは、第二次精母細胞後期に転写されたXtrのmRNAを用いてXtrの合成が開始されたと考えられる。

Figure2

(A) 様々な発生段階の卵母細胞および胚から抽出したサンプルのウェスタンブロット。免疫沈降とウェスタンブロット解析は、いずれも抗Xtr抗体を用いて行った。I-VI、卵子のステージ（Dumont 1972）；2、2細胞期；Mo、モルラ；G、ガストルラ；N、ニューロ；Tb、尾芽；Tp、オタマジャクシ（ステージ37/38）。(B) hematoxylin/eosin (a) または抗Xtr抗体で染色後、fluorescein isothiocyanate (FITC) - conjugated anti-rabbit IgG抗体 (b) で処理した精巣切片の顕微鏡写真。PG；一次精母細胞；SG；二次精母細胞；LZ；レプトテン-ジゴテン精母細胞；Pa；パキテン精母細胞；SC；二次精母細胞；RT；ラウンド精母細胞；MS；成熟精子。矢印はPGを、二重矢印はSGを示す。バー：50μm。

１５抗Xtr抗体が初期胚の開裂に及ぼす影響

Xtrの役割を理解する手がかりを見つけるために，アフィニティ精製した抗体を2細胞期胚の1つの胚盤胞に注入した。正常なウサギ免疫グロブリン（NRI）を注入した胚芽は正常に切断されるのに対し（図3A、a）、抗Xtr抗体を注入した胚芽は溝の形成が異常になり、ついには切断が停止してしまった（図3A、b）。この抗Xtr抗体の注入による胚盤胞の切断の乱れは、抗Xtr抗体の製造に使用したXtr融合タンパク質を抗原として抗Xtr抗体を同時に注入することで回復した（表1）。胚の連続切片を免疫組織化学的に観察したところ、抗Xtr抗体を注入した胚盤胞に由来する細胞（図3B、a、左半分）は、抗Xtr抗体を注入した胚盤胞間で完全な開裂停止のタイミングが異なるため、その大きさは様々であるが、正常な細胞（図3B、a、右半分）に比べて明らかに大きかった。また、分裂停止した細胞の核は、核膜と部分的に凝縮したクロマチンで構成されていたので、核の段階はプロフェイズと判断した（図3B、b）。これらの細胞では、メタフェースの核を観察したことはなかった。これらの結果から、抗Xtr抗体の処理によって核形成が阻害されることが示唆された。なお、抗Xtr抗体を注入した胚盤胞から得られた数個の細胞を除く多くの細胞は、核を持っていなかった。

１６Xtrの機能喪失が胚の分裂周期におけるCdc2活性の振動に及ぼす影響を調べるために、未受精卵に抗Xtr抗体またはNRIを注入した後、Cdc2のH1キナーゼアッセイを行った。NRIを注入した対照卵では、H1キナーゼ活性は、注入後10分で急速に減少し（卵の活性化とそれに伴う注入自体による減数分裂メタフェースIIの停止からの解放を表す）、徐々に増加し、60-70分でピークに達し（第1分裂メタフェースを表す）、80分で減少し（間期を表す）、90分で再び増加した（図3C；閉じた丸印）。抗Xtr抗体を注入した卵も、NRIを注入した卵と基本的に同じH1キナーゼ活性の動態を示した（図3C；開いた三角）ことから、少なくとも2細胞期までは抗Xtr抗体がCdc2活性の振動に影響を与えていないことがわかった。

１７次に、抗Xtr抗体が核分裂に及ぼす影響を調べるために、脱膜した精子の核とNRIまたは抗Xtr抗体を未受精卵に注入し、免疫組織化学的な観察を行った。NRIを卵に注入すると、注入後60分で、互いにくっついていた数個の核がクロマチンを脱離し、周囲に微小管の配列を持つ間期核となった（図3D、a-a''）。その後、80分にはクロマチンが凝縮し（図3D、b-b''）、100分には典型的な紡錘体を持つメタフェースプレートに整列した（図3D、c-c''）。図3（C）の60-70分におけるCdc2活性の最初のピークは、卵の活性化後の最初の分裂メタフェースを表しているので、このアッセイに使用したバッチのこれらの卵のCdc2サイクルの持続時間は、H1キナーゼアッセイに使用したバッチのそれよりも長いようである。しかし、NRIと一緒に未受精卵に注入した精子核の変化は正常に見えた。一方、抗Xtr抗体と一緒に未受精卵に注入した精子の核は、注入後80分で間欠期の核になった（図3D、e-e''）。精子の核は原相までゆっくりと変化し、その後は核運動が停止したようである。強調しておきたいのは、核の周囲には微小管の配列が観察されなかったことである（図3D、d-f''）。これらの観察結果は、Xtrが核の周りの微小管の集合と、原相からメタフェースへの核の変化に関与していることを示唆している。

１８私たちの以前の報告では、新規遺伝子であるXtrは、丸い精子と後期の細胞を除いて、精子形成細胞と卵形成細胞の両方で発現していた（Ikema et al.2002）。また、このmRNAは初期段階の胚にも存在し、その量はI期の卵母細胞からガストラ期まで一定に保たれ、それ以降は減少していた。本研究では、いくつかの違いを除いて、その翻訳産物（Xtr）の発現プロファイルがmRNAと同様であることを示した。精子形成期において、初代精子細胞と初期第二精子細胞のXtr mRNA量は少なく、有糸分裂期から減数分裂期への転換能力を獲得したばかりと考えられる後期第二精子細胞で増加していた（Takamune et al.2001）。一方、後期第二期精母細胞はXtrを少量保有しており、減数分裂期であるレプトテン-ジゴテン精子期に入ってからXtr量が増加していた。これらの結果は、第二次精母細胞後期にXtrの合成が抑制され、減数分裂期に入るとその抑制が解除されることを示しており、精子形成における減数分裂の進行にXtrが重要な役割を果たしていることを示唆している。有糸分裂期から減数分裂期への移行後にXtrの合成量が増加したのとは逆に，初代精原細胞と初代第二精原細胞ではXtrのmRNAの量が同程度であったにもかかわらず，初代第二精原細胞から初代第二精原細胞への分化後にはXtrの量が減少した。大量のXtrが存在することは、初期および後期の精母細胞にとって不利な条件であると考えられる。これまで我々は、Xenopusの精子形成細胞の発達段階を、その形態によって特定してきた（Kalt 1976; Takamune et al 1995, 2001）。精子形成過程におけるXtr遺伝子の転写・翻訳産物の量の変化から、Kalt（1976）が提案したXenopus精子形成細胞の形態学的分類が正確であることが証明されたことを述べておきたい。

Fig.3

胚の切断に及ぼす抗Xtr抗体の影響。(A）胚盤胞に正常ウサギ免疫グロブリン（NRI）（a）または抗Xtr抗体を注入した胚の概観。(B) 2細胞期、5時間培養後、矢印は抗Xtr抗体を注入した半面を示す。(b) (A, b)の胚の切片の顕微鏡写真。抗α-チューブリンで染色後、抗マウスIgG抗体（赤）およびHoechst（緑）で処理したもの。胚の左半分の細胞は、抗Xtr抗体を注入した胚盤胞に由来するものである。挿入図(b)は(a)の枠内を拡大したものです。(b)の矢印は、部分的に凝縮したクロマチンを示す。(C) 有糸分裂期のCdc2サイクルに対する影響。未受精卵にNRI（閉じた円）または抗Xtr抗体（開いた三角形）を注射し、Cdc2のH1キナーゼ活性にかけるために示された時間に収集した。H1キナーゼ活性を相対的に表現しています。(D) NRI (a-c′′) または抗Xtr抗体 (d-f′′) を注入した未受精卵の切片を、脱膜した精子核 (約50核) と共に撮影した写真。その後、60分（a-a′、d-d′）、80分（b-b′、e-e′）、100分（c-c′、f-f′）培養を行った。切片は抗α-チューブリン抗体で染色した後、抗マウスIgG抗体（赤）とヘキスト（緑）で処理した。バー：1 mm (A), 200 µm (B, a), および 20 µm (B, b; D).

表1. 初期胚の切断に及ぼす抗Xtr抗体の影響

2細胞期の2個の胚珠のうち1個に表記の物質を注入して5時間後に、注入した半数の裂開の異常を判定した。

１９本研究では、Xtrの機能を解明するために、卵や胚へのマイクロインジェクションを利用して、Xtrの機能を特異的に阻害することを試みました。Xtrには、複数のtudorドメインが存在する。チューダードメインは、他のいくつかのタンパク質にも存在しており（Ponting 1997）、その中でも、ラットTrap（Hirose et al.2000）やヒトSMNタンパク質（Liu et al.1997; Bühler et al.1999; Selenko et al.2001）のチューダードメインは、標的タンパク質との結合に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。これらの情報に基づいて、我々は、2つのチューダードメインを含むXtr-ヘキサヒスチジン融合タンパク質に対する抗Xtrポリクローナル抗体を、チューダードメインの機能不全によるXtrの機能阻害のための抗原として作製した。この抗Xtr抗体を初期胚の胚盤胞に注入すると、異常な溝形成が起こり、その後、開裂停止となった。この切断停止した細胞の中には、多くの無核細胞が観察され、核動原体を伴わない数回の細胞質分裂が進行していることがわかった。このような細胞質分裂抑制効果の遅れの原因は今のところ不明であるが、Xtrの機能低下により、核の周りに微小管の配列が形成されず、核分裂が異常に進行する（prophaseで停止する）ことが、この切断停止の起源であると考えられた。また、成長した卵母細胞の胚軸胞と細胞質に抗Xtr抗体を注入し、プロゲステロン処理を行ったところ、減数分裂のメタフェースIで紡錘体が形成されないことが予備的に確認された（データなし）。この結果は、Xtrが減数分裂時の微小管集合に関与していることを明らかにし、初代精子細胞にXtrが大量に存在することと一致している。したがって、この結果は、Xtrの役割を理解する上で重要になると考えられる。この結果を確認するためには、卵子の中に沈んでいる胚軸胞に抗Xtr抗体を完全に注入することができる新しいシステムを確立する必要があります。

２０微小管の組織化は、微小管関連タンパク質（MAP）によって制御されていることがよく知られており、Xenopusの卵では3つのMAPが同定されている（Andersen et al.1994; Vasquez et al.1994; Andersen & Karsenti 1997）。これらのMAPは、微小管に直接結合し、そのダイナミクスを制御している。Xtrの機能を喪失すると、核膜の周りに微小管の配列がなくなることから、Xtrは組み立てられた微小管上に局在すると予想された。しかし、Xtrが紡錘体や核膜周辺の微小管配列に局在していることは確認されていない（データ未提示）。Xtrはチューブリン結合ドメインを持たないが、N-terminal halfに複数のtudorドメイン、C-terminal halfに3つの繰り返し配列を持つ（Ikema et al.2002）。我々が最近行ったBLASTP解析（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）では、この3つの繰り返し配列がAAA-ATPaseのvon Willebrand factor type A (vWA)ドメインと配列が類似していることがわかった。このドメインは補体因子Bやインテグリンなど多くのタンパク質に存在し、その役割は金属を介したタンパク質間の相互作用であると予測されている(Lee et al. 1995)。Xtrの構造上の特徴から、このタンパク質は、MAPなどの調節タンパク質を運ぶシャトルタンパク質として働き、核の周りに微小管の配列を形成することが考えられる。

２１抗Xtr抗体を注射してXtrの機能を阻害しても、活性化した卵のH1キナーゼ活性の振動は妨げられなかったことから、Xtrは分裂期のCdc2サイクルに必須の役割を果たしていないと考えられた。Xenopus初期胚では、Cdc2サイクルは細胞分裂がない状態でも正常に発生することができる（Gerhart et al. 1984; Newport & Kirschner 1984）。したがって、抗Xtr抗体の作用による開裂休眠胚のCdc2活性の正常な振動は疑問視されない。Newport & Kirschner (1984)はまた、ノコダゾール（微小管組織化の阻害剤）で処理した開裂期停止胚では、核膜の破壊と染色体の凝縮が起こることを報告している。しかし，抗Xtr抗体を注入した胚では，核運動が原相で停止していた。このカリキネシスの異常な進行は、微小管の集合の欠如に起因するものではないようだ。Xtrは、核形成の正常な進行のために、いくつかの種類の分子カスケードに関与している可能性がある。

２２最後に、Xtrを発現している成体の体細胞は、これまで発見されていないことを強調しておきたい。前述のように、XtrはtudorドメインとvWAドメインから構成されており、これらのドメインはいずれも標的タンパク質との結合に役割を果たすことが予測されている。したがって、これらのドメインと関連するタンパク質の特徴を明らかにし、Xtrを含む核運動の進行に関わる分子カスケードを定義することは、成人個体の体細胞に対する生殖細胞の特徴を理解することにつながると考えられる。