

①

アフリカツメガエルの卵形成期にみられる
分布特異性細胞質抗原の同定とその解析

田 畑 純

< 目次 >

第 1 章 序論	pp. 1
第 2 章 <u>Xenopus</u> 卵細胞質に対する抗体の作製と選別	pp. 8
2.1 はじめに	8
2.2 免疫抗原の選択	9
2.3 モノクローナル抗体の作製	15
2.4 モノクローナル抗体の選別と分類	24
第 3 章 <u>Xenopus</u> 卵細胞質にみられる抗原分布	pp. 31
3.1 はじめに	31
3.2 分布特異性抗原の選別	32
3.3 分布特異性抗原の極性について	36
3.4 初期発生における分布特性	44
第 4 章 総括	pp. 46
謝辞	pp. 52
引用文献	pp. 53
表と図	pp. 61

第 1 章 序 論

魚類をはじめ、両生類・鳥類・哺乳類にいたるまで脊椎動物の卵はほぼ球形であり、かつまた単一の細胞である。しかし、受精によって一旦発生を開始すると、急速な細胞分裂（＝卵割）を繰り返し、その細胞数を対数的に増加していく。卵割によって生じた細胞（＝割球）は、単一の細胞に由来するにもかかわらず、それぞれ異なった発生運命を持ち、それぞれに従って多様な細胞へと分化していく。

この初期発生の時期は、個体の生涯の中でも特異な時期である。なぜならば、①内部に蓄えた栄養成分のみに頼り、外界から栄養を摂取しない ②極端に速い周期の細胞分裂を行う（S期とM期のみでG₁期とG₂期が無い） ③転写活性が無いかもしくは極端に低いといった通常ではみられない細胞の生理特性を示すからである。加えて、「調節」と呼ばれる発生学的に著名な現象がある。これは1個の胚が、なんらかの要因で、2個以上に分離されたときに、それぞれが発生を調節して、各々、完全な1個の成体となる現象である。例として、ヒトの一卵性双生児が挙げられ、このような調節能力をもつ状態を「全能性がある」という。全能性は、一般に発生のごく初期に限られ、発生が進むにつれ、急速に失われる。

本研究は、こうした初期発生の理解のための研究の一環として、行われたものである。実験動物としては、発生生物学において最もよく利用される動物のひとつであるアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）を用いた。無尾類は、卵を大量に生み、体外受精を行うため、初期発生の研究には好適である。とりわけ、アフリカツメガエルは年中産卵が可能なこと、ホルモン処理で産卵を促せること、飼

育が容易なことなどの利点があり、初期発生に関しては、実験形態学的研究のみならず、分子生物学的研究も進んでいる実験動物である。発生段階についてもすでに十分な記載があり、本論文では、卵形成期を Dumont (1972) の発生段階表 (ローマ数字で表記、st. I ~ st. VI)、受精期を Gerhart (1980) や Ubbels ら (1983) の提唱した発生段階表 (小数で表記、 $t = 0.0 \sim t = 1.0$)、発生期を Nieuwkoop と Faber (1967) の発生段階表 (アラビア数字で表記、st. 1 ~ st. 66) に従って表記した。

両生類・爬虫類・鳥類など、初期発生中の母胎への依存度が低く、採餌できるようになるまでの時間が長い動物では、初期発生に備えて大量の栄養物質と遺伝物質、細胞内小器官を卵の中に蓄える。アフリカツメガエルでは、卵母細胞の核 (= 卵核胞) が巨大であり、多くの DNA 結合タンパク質や、通常 2 個の核小体を 1000 個以上も蓄えている。また、細胞質には通常の数万倍ものリボゾームを蓄えている (塩川, 1985; Hausen and Riebesell, 1991)。これらは、量の上で必要以上が蓄えられていることが知られており、栄養面やタンパク質合成活性の面で確実な発生を保証していると考えてよいであろう。一方、必要な量だけが用意されている因子の存在も示唆されている。例えば、転写を阻害する DNA 結合因子が 12 回目の卵割後に欠乏するようになること (Newport and Kirschner, 1982a, 1982b)、18S, 28S rRNA 合成の阻害因子が卵割の期間存在すること (山名, 1973)、二次胚形成能をもつ因子が 64 細胞期には植物半球の背側割球にのみ存在すること (Gimlich and Gerhart, 1984) などである。また、割球の欠損および組換え移殖実

験によって、8細胞期における各割球間の発生能力の上での異質性が明らかにされており、2細胞期、4細胞期における割球欠損実験による発生調節の可否から、アフリカツメガエルのごく初期の胚（～8細胞期）においては細胞質の部分的異質性が存在することと、それが初期発生に重要な働きを持つことが示されている（Kageura and Yamana, 1983, 1984, 1986）。

こうした卵の部分的異質性については、ウニ卵やホヤ卵などでも知られており（金谷, 1975; 佐藤・西田, 1989）、「胚の発生のごく初期では、細胞質の不均一性がきわめて重要であり、それが遺伝子活性に影響を与えるであろう」（Morgan, 1934）ことは今や疑う余地がない。しかし、このように発生を制御する因子の存在が強く示唆されているにも関わらず、その実体は明らかになっておらず、化学的な性質も不明の点が多い。発生能力の点で細胞質の異質性をもたらすことのできる物質（発生制御因子）の候補としては、タンパク質性因子、mRNA、低分子物質などがあげられるが、本研究ではタンパク質性因子に絞ってその探求を試みた。遺伝子活性を制御する分子としてはタンパク質が第1に考えられるからである。

卵母細胞には、さまざまなタンパク質が蓄えられているが、mRNAの研究と比べ解明されていることは僅少である。その理由として、個々のタンパク質を取り上げて定性的研究を行うのが難しいことや、定量的な研究を行う際に、検出感度の制約が大きいことがあげられる。このため卵の細胞質に蓄積されているタンパク質、例えば、卵黄タンパク質（Danilchik and Gerhart, 1987）、リボゾーム構成タンパク質（Delaunay et al., 1975; Viel et al., 1990）、ヌクレオプラズミン（Krohne and Franke, 1980; Dilworth et al.,

1987)、ヒストン (Woodland and Adamson, 1977; Dilworth et al., 1987)、細胞骨格分子 (Wylie et al., 1985, 1986) などを中心に研究が進んでいるのが現状である。しかし、近年、長足の進歩を遂げた免疫学的な技術と、細胞融合法によるモノクローナル抗体作製 (Köhler and Milstein, 1975) を導入することで、微量なタンパク質についての研究の糸口がつかめることが考えられた。これらの技術は、個々のタンパク質ひとつひとつを識別し、検出することを可能にするからである。そこで、本研究では、モノクローナル抗体の作出を行い、免疫学的なタンパク質の検出技術を導入することにした。

一般的に、モノクローナル抗体を作製するときには、用いる抗原として精製されたタンパク質、またはある程度分画されたタンパク質が必要である。しかし、発生を制御する因子の化学的性質がほとんど明らかにされていないため、本研究目的において精製や分画を行うことは不可能である。そこで、卵黄を取り除く作業以外には精製や分画を行わない、いわばバルクな抗原から出発し、多数の抗体を得た後、この中からさまざまなスクリーニングによって候補を絞っていくという方法を選択した。この方法では、免疫の段階やスクリーニングの段階で相当な困難が予想されたが、同時に、従来未知であった卵黄以外のタンパク質の卵形成期における蓄積パターンを明らかにできることが期待された。そこで、卵形成期における細胞質中のタンパク質蓄積のパターンを明らかにすることを本研究のまず第1の目的とした。

成熟したアフリカツメガエルの卵母細胞は、赤道面付近を境とし

て、色素顆粒の集中した動物半球と、色素顆粒の無い白い植物半球にわけられる(図1; Dumont, 1972)。これら両半球の極をむすぶ線を動植物軸といい、卵はこの軸を中心に極性を持った回転対称構造をなしている。また内部においても、大きさの異なる数種の卵黄顆粒が、小さい順に動物極から植物極に向かって不連続に分布している(Neff et al., 1984)。未受精卵における極性の存在を発生能力の点から明らかにした実験はないが、8細胞期での動物・植物割球の発生運命の相違や、受精直後の卵表層下の細胞質の回転運動によって形成される背腹軸(Vincent et al., 1986)が、動植物軸性に依存しているように見えること(Gerhart et al., 1989)などから、初期発生を制御する因子は少なくとも動・植物半球のどちらかに偏って分布していることが予想される(佐藤・景浦, 1989)。

ところで、先に述べた細胞の異質性をもたらす物質の候補のうち、mRNAについては、動植物軸性に従った領域性をもつことがすでに明らかになっている。例えば、poly(A)⁺RNAは成熟卵では植物半球側に多く偏って分布するようになること(Capco and Jeffery, 1982)や、動物半球または植物半球に限定して分布するmRNAの存在(Melton, 1987; Rebagliati et al., 1985; Kloc et al., 1989)などである。このことは、これらの翻訳物であるタンパク質も極性分布する可能性を強く示唆するものである。一方、凍結した未受精卵の断片から抽出したタンパク質試料を電気泳動して成分を比較するという方法で、動物半球または植物半球に偏って分布する可溶性タンパク質が検出されている(Moen and Namenwirth, 1977; Jackle and Eagleson, 1980)。しかし、これらの報告は極性分布のタンパク質が存在することを示したのみで、卵の内部にどのように

分布するのか、卵形成期においてどの様に蓄積するのかは明らかにしていない。そこで、こうした動植物軸性に沿った極性を示すタンパク質を明らかにし、その極性分布の形成パターンを明らかにすることを本研究の第2の目的とした。

本研究は、以上のように、初期発生研究の一環として企画され、①卵形成期に於けるタンパク質の分布の様子を明らかにすること、②動植物軸性に従った極性分布タンパク質を明らかにし、その極性分布形成のパターンを明らかにすること、という2つの目的にそって進められた。最終的な研究目標は、初期発生を制御する細胞質因子を明らかにすることである。なお、本研究の成果は、これまで未知であった卵形成期に於けるタンパク質の蓄積パターンの解明のみならず、得られた抗体の利用によって、アフリカツメガエルの初期発生研究に少なからず貢献できることにある。現在、アフリカツメガエルの遺伝子レベルの研究では、遺伝学的な手法が利用できるマウス (*Mus musculus*) やキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) で得られたプローブを用いることが多い。しかし、アフリカツメガエルを材料に実験を行う場合、アフリカツメガエルから得られたプローブで行う方が、より望ましい場合もあるであろう。本研究で得られた抗体は、例えば、抗体注入実験や初期発生における抗原分布の解析などに用いることで、アフリカツメガエルの初期発生について、今後、一層多くの知見をもたらすはずである。また、抗体が認識する抗原の遺伝子を卵のcDNAライブラリーから得ることも可能であり、これにより遺伝子レベルでの解析へと展開できるはずである。

初期発生研究にとって、無尾類が好適な実験動物であることは、すでに述べた。歴史をひもとけば、初めて卵割が観察されたのも無尾類を用いてであり (Swammerdam, 1668)、それ以来、無尾類の卵は、多くの発生生物学的知見を我々に与えてきた。しかし、卵という巨大な単一細胞の構造や生理、初期発生における各割球の生理特性や発生運命の決定においてどのような物質がどの様にはたらいているかを知るには、なお解析が必要である。そして解析の成果は、無尾類の発生についての理解にとどまらず、必ずやすべての動物発生に共通の機構解明へとつながるはずである。本研究は、こうした機構解明への足掛かりとして始められた。

2.1 はじめに

多くの動物種の卵には、卵形成期に長い期間をかけてさまざまな物質が大量に蓄えられる。アフリカツメガエルの場合、貯蔵物のうち最も多いのは卵黄タンパク質で、全タンパク質重量の 80% を占めるほどである (Callen et al., 1980b)。リボゾームタンパク質、ヌクレオプラズミン、ヒストンなどもこれについて多く存在し、RNA ポリメラーゼの量は通常細胞の $1 \sim 5 \times 10^5$ 倍も蓄えられていることが知られている (Gurdon and Wakefield, 1986)。従って、こうした構成タンパク質以外の微量なタンパク質に対する抗体を少しでも効率よく作製するには、①抗原をどの様に調製するか、②得られた抗体をどのように選別するか、が重要な課題となる。

本章では、これらの課題をどのように解決したかを順を追って述べ、更に、免疫組織化学的染色の結果を示す。得られた抗体の多くは、卵形成期の全ての段階の卵母細胞の細胞質を均一に認識したが、10 個の抗体は、特定の段階の細胞質抗原を認識して時期特異性を示し、その特異性から 2 群 (type E, L) に分類が出来た。また 22 個の抗体は、卵母細胞の特定の部域のみを認識して分布特異性を示し、その特異性から 4 群 (type A, V, N, P) に分類した。

2.2 免疫抗原の選択

<材料と方法>

アフリカツメガエル

アフリカツメガエルは浜松生物教材から購入し、研究室内で毎週1回、牛レバーを与え、水温20℃前後で飼育し、適宜、実験に用いた。卵巣を得るときは、10%のMS222（三共製薬）溶液0.1～0.6mlを成体雌の腹腔内に注射して麻酔を施したのち、外科的にとりだした。一定の大きさの卵母細胞は、次項で述べるコラゲナーゼ処理とナイロン網による選別により得た。

未受精卵は、約3カ月おきに産卵するよう管理された体長7～8cmのアフリカツメガエルから得た。成体雌の背部リンパ嚢に、胎盤性性腺刺激ホルモン（“動物専用ゴナトロピン”；帝国臓器）を200～300IU投与後、遮光して20℃で静置、8時間後に手技により産卵を促し、0.15%食塩水中でこれを集めた（生理濃度～生理濃度の4分の1程度の食塩水中では、ゼリーの付着性が阻止でき、扱い易い）。集めた未受精卵は、置き水でよく洗浄した後、pH8.5～9.0の2.5%チオグリコール酸ナトリウム溶液で脱ゼリー処理を行ない、再びよく洗浄して実験に用いた（Kageura and Yamana, 1983）。

前卵黄形成期の卵母細胞の調製

摘出した卵巣を1%コラゲナーゼ（和光純薬）／Ca²⁺ Mg²⁺ フリー溶液（Kawahara's CMF；5.5g NaCl-0.14g KCl-0.44g sodium

pyruvate-0.9g glucose-5.0g BSA-2.38g HEPES per 1 liter, pH 7.3; Kawahara et al., 1981) 5 ml 中で細切し、30℃で0.5～2.0時間、緩やかに振盪した。ときどき実体顕微鏡下で観察し、ろ胞細胞や卵巣を構成する細胞群が卵母細胞からすべて解離するのを待ち、解離後、Kawahara's CMF でよく洗い、上清中のろ胞細胞を取り除いた(澤田, 1983)。

卵母細胞は、Kawahara's CMF 中で目のサイズが200 μ mのナイロン網('Nytal', #7XX-200; Swiss Silk Bolting Cloth)を用いて、以下の方法で選別した。まず、ナイロン網をプラスチック円筒内に固定して、この円筒をKawahara's CMF を十分に注いだ50 mlの小ビーカー中にセットした。円筒内部に脱ろ胞した卵母細胞を静かに落とすことで、前卵黄形成期の卵母細胞(直径50～300 μ m)のみを小ビーカーの底面に集めることが出来た(図2)。

未受精卵の薄切試料からのタンパク抽出と電気泳動

-20℃冷メタノール中で2時間以上おいて固定した1個の未受精卵を試料とし、冷エタノールに移して室温で30分間静置した後、エタノールシリーズで脱水し、ポリエステルワックスによる包埋を行った(ポリエステルワックス法の詳細は後述)。薄切は、6～8℃に調整したクライオスタット中で、回転式マイクロトームを用いて行った。切片は16 μ mの厚さにし、これを5枚1組として、エッペンドルフチューブ内の4℃エタノール中に集め、試料とした。各試料は、37℃で30分間加温による脱ワックスの後、700×g、10分の遠心を行い、上清を除去した。この操作は、合計3回繰り返し、脱ワックスを終了した。脱ワックス後は、エタノールを

丁寧に除去し、試料をよく乾燥した後、Sodium-dodecyl-sulphate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプル緩衝液 (0.1M Tris-0.6M Glycine-0.2% SDS) を $10 \mu\text{l}$ ずつ滴下してタンパク質変性を行った。その後、 $5,000 \times g$ 、10分の遠心を行い、上清を集め、電気泳動試料とした。

電気泳動は Laemmli (1970) の方法に従って行った。ポリアクリルアミドゲル濃度は15%のものを用い、各レーンには各断片から得られた電気泳動試料の全量をそれぞれのせて泳動した。泳動後は、タンパク質を銀染色 (Oakley et al., 1980) し、泳動パターンを肉眼による観察とデンストメーター (DCD-16; Gelman) を使用して行った。

抗原の調製

体長3.0～3.5 cmの成体雌から卵巣を取り出し、上述したコラゲナーゼ処理と卵母細胞のサイズ別選別を行い、前卵黄形成期 (st. I) の卵母細胞を単離した。これを2/3希釈のリン酸緩衝塩溶液 (PBS; 0.01M Phosphate-0.15M NaCl, pH7.5) に移し、抗原として用いた。

体長7 cm前後の成体雌から人工産卵により未受精卵を得た。脱ゼリーの後、形態が正常な未受精卵を200～300個集めて、2/3希釈のPBS 4 ml中に移し、 $105,000 \times g$ で70分間の遠心分離をして、上清を抗原として得た (S100分画)。保存の際は、 -80°C で凍結して保存した。

タンパク定量は、牛血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) を標準タンパク質として、BCA試薬 (Bicinchoninic acid

reagent; #23320; Pierce) を用いて行った (Smith et al., 1985)。電気泳動は、Laemmli (1970) の方法で、ゲル濃度を 10% とし、各レーンにはタンパク量を 12 μ g ずつに調整して泳動した。泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した (Reisner et al., 1975)。

< 結果と考察 >

まず、第 1 の実験として、発生を開始する直前の状態である未受精卵を用いて、その内部に蓄えられているタンパク質が、どの程度極性を持って存在しているのかを調べた。比較的、穏やかに固定できるエタノールで固定し、ポリエステルワックスに包埋した 1 個の未受精卵を、動物植物軸に対して垂直に薄切して 12 層に分割したのち (図 3 A)、SDS でタンパク質を各断片から抽出して、15% 濃度のポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行い、銀染色を行った (図 3 B)。染色の結果は、さらにデンストメーターで各レーン毎に 600 nm の波長で測定し、それぞれのタンパク質分布パターンを得た (図 3 C)。これらの結果、部域性を持ったタンパク質が多数存在することがわかった。分子量 40,000 ~ 50,000 の領域と 21,500 以下の領域には、特に部域性タンパク質が多くみられ、その部域性は、動物半球側に偏っているものと、植物半球側に偏っているものに分けられた。

またこの結果は、未受精卵 1 個の内部に SDS-PAGE の銀染色で検出される程度に [検出感度は 0.38 ng/mm² (Switzer et al., 1979)、または、~2-5 ng/protein band (Sasse, 1987)]、部域

性のあるタンパク質が存在することを示し、免疫学的手法でも十分に検出されうることを示唆した [検出感度はラジオイムノアッセイ (R I A) の時、1-50 ng/ml (Steward and Male, 1989)] 。一方、卵黄タンパク質のフォスビチンとリポビテリン L₁, L₂ (Bergink and Wallace, 1974) が相当量含まれており、植物半球側により多く存在することから、卵黄タンパク質を効果的に除去する方法があれば、こうした特異性分布のタンパク質の検出にはきわめて有効であると思われた。そこで、免疫に用いる抗原には、この点を考慮して、2種類の抗原を準備した。

第1には、卵黄が蓄積する前の時期 (前卵黄形成期 ; st. 1) の卵母細胞を抗原材料として用いた。卵形成期のもっとも初期であるこの時期の細胞質中にどれほどの種類のタンパク質が貯蔵されているかは不明であるが、卵形成期の終期の卵母細胞中で見られるすべての種類の m R N A が存在しており (Rosbash and Ford, 1974) 、しかも翻訳活性も変わらないことが知られている (Tayler and Smith, 1985) 。これらのことは、前卵黄形成期の卵母細胞にも初期発生に必要なタンパク質の多くが、すでに含まれている可能性を示唆している。免疫の際は、P B S 中に卵母細胞を浮遊した状態にし、そのままマウスに投与した。この方法は、細胞内小器官内の抗原が流出しにくく、細胞質中の抗原を対象とするのに向いている。

前卵黄形成期の卵母細胞は、かなり若い成体 (体長 3 . 0 - 3 . 5 c m) からとりだした卵巣をコラゲナーゼ処理した後、ナイロン網を用いて選別した。十分にコラゲナーゼ処理を行うことと、充分な量の C M F 溶液中で 1 g の自由落下によって網を通るようにすること、この2点に留意することにより、大量のサイズの揃った卵母細胞

胞を得ることが可能になった（図 2 A）。Dumont（1972）の発生段階は卵母細胞の大きさと形態を基準に記述されており、サイズの揃った卵母細胞はすなわち発生段階が揃っているといえる。単離した卵母細胞は顕微鏡下で観察すると透明で、卵黄顆粒の蓄積がまだ始まっていないことが確認できた（図 2 B）。

第 2 には、未受精卵の S 1 0 0 分画を抗原として用いた。この分画は、卵成熟促進因子（Maturation-promoting factor; MPF）の活性分画としても知られ、卵細胞質の可溶性タンパク質を多く含む分画である（Masui and Markert, 1971; 増井, 1986）。この分画中に、初期発生に必要なタンパク質が含まれている保証はないが、卵黄、ミトコンドリア、リボゾームなどを構成するタンパク質が除去されており、初期発生をまさに始めんとする卵から抗原を調製するには、この方法が最適であると考えた。

準備した 2 種の抗原は、それぞれ、BCA 試薬を用いてタンパク質濃度を測定し、免疫時に適正量投与できるようにした。また、SDS-PAGE によって、その構成成分中に卵黄タンパク質であるフォスビチン、リポビテリン L₁, L₂ のないことと、さまざまな種類のタンパク質のバンドが検出できることを確認した（図 4）。特に、両者とも分子量 40,000 ~ 50,000 付近に多くのバンドがあり、領域性を持った抗原が多く含まれていることが期待された。

2.3 モノクローナル抗体の作製

<材料と方法>

BALB/c マウス

BALB/c マウスは静岡動物協同組合から購入したものを繁殖させて用いた。餌には固形試料（日本クレア）を充分与え、室温、照明、湿度などに気を付けて飼育した。脾臓や胸腺は、エーテルで麻酔したもしくは延髄の破壊によって屠殺したマウスから摘出した。血液採取の際は、尾静脈を剃刀で傷つけて必要量を得た。また、臓器摘出のために屠殺した個体からは、腋下静脈を切開して血液採取した。血液は4℃に静置して血餅を充分に発達させたのち、血清成分だけを分取して、抗血清として用いた。

免疫

抗原1mgを300～400μlのPBS（pH7.6）に溶かし、7週齢のBALB/c雌マウスに腹腔内注射によって投与した。初回は、Freundの完全アジュバント（#0638-60-7; Difco）を抗原溶液（タンパク量1mg）と等量混和し投与した。追加投与は免疫が成立するまで2週間おきに行い、500μgを300～500μlのPBSに溶かして投与した。

免疫の成否は、抗原の腹腔注射から2、3日後の血清中の抗体価によって判定した。抗体価の検定には、ELISA法（Enzyme-linked immunosorbent assay; 後述）を用いて、免疫抗原に対して血清の希釈系列を反応させて確認した。およそ300倍以上の力価

が出たときに免疫が成立したと判断した。

ミエローマ細胞

ミエローマ細胞は、広島大学生物生産学部助教授の松田治男博士よりいただいた S p 2 / 0 - A g 1 4 (Shulman et al., 1978) を継代して増やし、これを用いた。通常は凍結保存しておき、細胞融合の期日より 8 日ほど前に解凍して途中 1 回の継代を行い、細胞融合を行う当日には細胞密度が $0.8 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞 / m l になるように増殖を調整した。

培養容器には底面積 75 cm^2 の組織培養用ボトル (#MS-20250; 住友ベークライト) を用い、10% の牛胎児血清 (Fetal Calf Serum; FCS; Boehringer Mannheim) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dalbecco's Modified Eagle Medium; DMEM; #05915; 日水製薬) を培地として、 CO_2 インキュベーター中で pH 7.6 前後に保って細胞を培養した。インシュリンを $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で加えるとミエローマ細胞の状態が良好となったので融合実験を行う日の前後の数日間は、インシュリンを添加した培地中で培養した (Feit et al., 1984)。

脾細胞

摘出した脾臓を DMEM 中でよく洗ったのち、10 ml 注射器を用いて、脾細胞を水流で押し流し 10% FCS - DMEM 培地中に遊離させた。充分遊離したら、これを注射器中に吸い取り、針先を上にして 5 分間程静置した。直立した状態の注射器筒内の上清中では、小さな細胞の脾細胞や赤血球細胞が上部に遊離し続けるが、よ

り大きな細胞である繊維芽細胞などが下方に沈澱する。そこで、注射器を直立させたまま針先だけ曲げて脾細胞などが遊離している上清のみを静かに遠心管へと移した。そして、 $180 \times g$ 5分の遠心後、沈澱の細胞塊に塩化アンモニウムトリス溶液を1ml添加、懸濁し、水中で4分間静置し、溶血処理を行った（松橋ら, 1981）。処理後は、速やかに10mlの10% FCS-DMEMで希釈し、 $180 \times g$ 5分の遠心後、沈澱の細胞を脾細胞として用いた。1匹のマウスから取れる脾細胞は、およそ $2.0 \sim 2.5 \times 10^8$ 細胞であった。

細胞融合

ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (Koch-Light) もしくはPEG 4000 (ガスクロマトグラフィ-用 #9727; Merck) を使用して細胞融合を行った。細胞融合の当日、オートクレーブで滅菌した後、 37°C まで冷やしてから、40~50% PEG-DMEM (PEG溶液) を調製し、そのまま 37°C に保温した。

前述の方法で、脾細胞、ミエローマ細胞をそれぞれ集めた後、脾細胞：ミエローマ細胞が10：1になるようにミエローマ細胞数を調整して50mlのプラスチック遠心管内で混和した（安東, 1983）。よく懸濁の後、 $250 \times g$ 5分の遠心を行い、上清を除去した。遠心管底部に集められた細胞塊を軽い振動で薄く底部にひろげた後、PEG溶液1mlを1分かけて、振盪しつつ添加した。振盪はピペット等で強く攪拌するか、ヴォルテックスを使用して行った。PEG溶液添加後もさらに1分間振盪を続け、PEG 6000使用の際はその後、 37°C で3分間保温静置した（Matsuda et al., 1985）。

PEGの除去と細胞の再懸濁は、以下の方法で行った。最初はDMEM 1 ml を1分かけて、次に8 ml を2～3分かけて滴下、懸濁した。次に、 $180 \times g$ 3分で遠心して、上清を除去した後、5% FCS - DMEM を2 ml 添加し、ていねいに細胞を懸濁した。さらに5% FCS - DMEM を8 ml 添加して総量10 ml とし、細胞数を計数し生存率を算出した。ミエローマ細胞（ハイブリドーマ細胞を含む）の融合後の生存率は、20～40%であった。

細胞懸濁液は、脾細胞の密度が 2×10^6 細胞/mlになるようさらに希釈した。通常、40 ml を加え、総量50 ml とするとおおよそ適正濃度となった。これを96穴プレート（'Falcon' #3072; Becton Dickinson）の各ウェルに100 μ l ずつ分注した。

H A T 選 択

H A T (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) 培地は、50倍濃度H A T 溶液（#644579; Boehringer Mannheim）を10% FCS - DMEM に加えて作った。細胞融合の翌日、ハイブリドーマを蒔いた96穴プレート各ウェルにH A T 培地を100 μ l ずつ添加し、2日目と3日目は、上清100 μ l を捨て、H A T 培地を100 μ l 添加した。また3日目は、BALB/cマウス5週齢雄より胸腺を摘出し、胸腺細胞を脾細胞と同様にして遊離させ、これをフィーダー細胞として1ウェルあたり約 1×10^6 細胞ずつ加えた（Matsuda et al., 1985; 安東, 1983）。

フィーダーを加えてからは、3～5日おきにH A T 培地を交換した。7～10日たつと、生き残ったハイブリドーマがコロニー形成を始めたので、2週間後に、H T (hypoxanthine and thymidine)

培地に切り替え、HAT選択を終了した。HT培地は50倍濃度HT溶液(#623091; Boehringer Mannheim)を、10%FCS-DMEMに加えて調製した。

抗体濃度の判定

ニトロセルロース紙(#401-099; Schleicher & Schuell)にハイブリドーマの培養上清を1 μ lずつ落とし、よく吸着させた。ニトロセルロース紙が乾燥した後、3%BSA/PBS中で30分間振盪し、ブロッキングを行った。その後、0.05%Tween 20/PBS(TPBS)で洗浄し、1次抗体として、HRP標識ヤギ抗マウス抗マウスIgG+IgM(H+L)抗体(#041809; KPL)またはHRP標識ウサギ抗マウスIgG抗体(#61-6020; Zymed)を30 μ lずつ分注した。1時間後、TPBSで洗浄し、基質としてABTS(2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate])-H₂O₂溶液(#506200; KPL)を与えた。以上の操作により、上清にIgGかIgM抗体が含まれている場合は、上清を吸着させた部分が茶褐色を呈する。

E L I S A 法

抗原をpH9.8のトリス緩衝液で希釈してタンパク濃度200 μ g/mlに調整し、ポリスチレン製のELISA用96穴プレート('Falcon' #3915; Becton Dickinson)の各ウェルに30 μ lずつ分注した。37 $^{\circ}$ Cで1時間静置したのち、抗原を除去し、1%BSA/PBSでブロッキングを行った。1時間後TPBSで洗浄し、ハイブリドーマ培養上清を30 μ lずつ分注した。1時間後TPB

S で洗淨し、2 次抗体として、H R P 標識ヤギ抗マウス抗マウス I g G + I g M (H+L) 抗体 (#041809; KPL) または H R P 標識ウサギ抗マウス I g G 抗体 (#61-6020; Zymed) を 3 0 μ l ずつ分注した。1 時間後、T P B S で洗淨し、基質として A B T S (2,2'-azinodi-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) - H₂O₂ 溶液 (#506200; KPL) を与えた (保井, 1983)。

抗原を認識できる抗体を含むハイブリドーマ上清を分注したウェルは、以上の操作で濃い緑色を呈する。この発色の度合は、4 0 5 n m 波長のフィルターをつけてタイターリーダー (MPR4A; 東ソー) で測定した。陽性対照としては、免疫したマウス抗血清を P B S で 1 0 0 倍に希釈して用いた。陰性対照としては、非免疫マウス血清を P B S で 1 0 0 倍に希釈して用いた。発色の相対的な度合は、肉眼での観察によってもかなり正確に判別でき、適宜これを行った。

また、塩化ビニル製の E L I S A 用 9 6 穴プレート ('Falcon' #3912 平底プレート、#3913 丸底プレート) も用いた。前述のポリスチレン製プレートと比べ、バックグラウンドが高く出やすい傾向があったが、吸着性が 2 ~ 3 倍優れており、適宜使用した。

限界希釈法によるクローニング

個々のハイブリドーマごとに、9 6 穴プレートの各ウェルから細胞を集め、これらを 1 0 % F C S - D M E M で、1 0² ~ 1 0⁵ 倍に希釈し、それぞれを 1 0 0 μ l ずつ 9 6 穴プレートの 8 ウェルに蒔いた。翌日、フィーダーとしてマウス胸腺細胞を加え (安東, 1983)、培地交換をせずに培養し続けた結果、プレートに蒔かれた細胞は、およそ 1 0 日 で十分なコロニー形成を遂げた。ひとつのウェルにひ

とつのコロニーのみができている場合にのみ、モノクローナルになったものとし、上清をスクリーニングしたのち細胞を凍結保存した。

ハイブリドーマ細胞の維持と凍結保存

ハイブリドーマ細胞は、HAT選択の時をのぞいて常に10% FCS (#210471, Boehringer Mannheim) - DMEM中で培養した。細胞密度は、決してコンフルエントにならぬよう3~4日おきに継代を行った。

細胞の凍結は、10%ジメチルスルフォオキシド(DMSO) / FCSを用いた(佐藤, 1976)。細胞を凍結用チューブ('アシストチューブ' #72.693; Sarstedt)に集め遠心し、沈澱した細胞に $2 \sim 3 \times 10^5$ 個の細胞当り100 μ lのDMSO / FCS溶液を加え、よく懸濁の後、発泡スチロール製のホルダーに入れて、 -80°C ディープフリーザー中に移して凍結した。DMSOは毒性が強いため、DMSO添加の後にはなるべく迅速に操作を行った。凍結の翌日さらに液体窒素の入った細胞凍結用ストッカーへと移した。

再び細胞を増殖させる時は、ストッカーから凍結チューブを出して、 $30 \sim 50^\circ\text{C}$ の温浴により解凍した。充分解凍したら、即座に遠心してDMSO上清を除去し10% FCS - DMEMを加え、再び遠心、上清交換を行った。解凍後の細胞数は、凍結時の約70%に減っており、そのうち生細胞の占める割合は約70%であった。すなわち、凍結時の約50% ($70\% \times 70\%$)の細胞が、保存されたことになる。

なお、 -80°C でもかなりの期間の保存が可能であり、クローニング前の細胞などは、仮凍結として -80°C 中で保存した。仮凍結

した細胞でも7カ月後に解凍すると液体窒素下で凍結したものとほとんど変わらぬ生存率を示し、簡便な保存法として利用した。

モノクローナル抗体の命名

すべてのモノクローナル抗体は、免疫抗原を示すアルファベット2文字（前卵黄形成期の卵母細胞ならP V、未受精卵のS 1 0 0分画ならE S）と得られた順序を示す数字の組合せによって命名した。例を示すと、P V - 1 2 抗体、E S - 5 7 抗体、などである。また、これらが認識する抗原を便宜上、P V - 1 2 抗原、E S - 5 7 抗原、として表記した。

< 結果と考察 >

前卵黄形成期の卵母細胞とS 1 0 0分画をそれぞれ免疫抗原として用い、2週間おきに3回の投与でいずれも免疫が成立した。免疫成立個体から摘出した脾臓から脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール法により、B A L B / c 由来のミエローマ細胞S p 2 / 0 - A g 1 4 と細胞融合した。細胞融合直後の生存率（ミエローマまたはハイブリドーマが対象）は、つねに15%前後であった。H A T 選択はその翌日から行い、約2週間後、生き残ってコロニーを形成しているハイブリドーマの上清を用いて、最初のスクリーニングを開始した。

前卵黄形成期の卵母細胞からは3回のハイブリドーマ作製を行い、1 2 3 個のハイブリドーマを得た。未受精卵のS 1 0 0分画からは2回の作製を行い、3 4 2 個のハイブリドーマを得た。これら合計

465個のハイブリドーマの培養上清を、免疫抗原に対するELISAスクリーニングに用いた。ELISAで、陽性にでたものは、免疫抗原に対する抗体産生を行っているハイブリドーマと判定できる。一方、陰性なものは、抗体産生を行っていないか、上清中の抗体濃度が低いためであると考えられた。そこでこれらの陰性なものは抗体濃度の判定を行い、もしも抗体濃度が低ければ、抗体量が増えるのを待って、数日後、ふたたびELISAで調べた。ELISA陽性のハイブリドーマは、限界希釈法によりクローニングし、凍結保存する一方、その上清は、モノクローナル抗体溶液として、以降の免疫学的解析に用いた。

2.4 モノクローナル抗体の選別と分類

<材料と方法>

切片の作製

10%中性緩衝ホルマリン溶液で2時間以上固定した組織を試料とした。脱水は、PBS中に試料を1時間以上おいたのち、70%エタノールに移し、30分おきに90%、99%、100%とエタノールの濃度をあげて行った。包埋剤にはアルコールを溶剤とし融点が37℃のポリエステルワックス(#36070; BDH)を用いた。まず、50%溶液中で2時間、90%溶液中で1時間、96%溶液中で1時間の振盪を行って、組織試料にワックスをよく浸潤させた後、試料をアルミホイルで作った包埋容器中に移して氷上冷却し、96%ワックス中に包埋した。凝固の後は、ビニール袋に入れ密封して4℃で保存した(Steedman, 1957; Kusakabe et al., 1984)。

薄切は回転式マイクロトームを用い、6~8℃のクライオスタット(Damon/IEC)庫内で行った。切片の厚さは、8 μ mとした。伸展は、0.05~0.025%トリトンX-100溶液をスライドガラス上に滴下し、その溶液に切片を浮かべるようにして行った(Kusakabe et al., 1984)。スライドガラスは、切片接着のために卵白アルブミンであらかじめコートし、よく乾燥させておいた(Nakane, 1975)。また複数の切片を同一スライド上に伸展させるときは、PAPペン(大道産業)でスライド上に疎水性の境界をひいた。切片が伸展したら、伸展液を静かに取り除き、4℃で乾燥、保存した。

免疫組織化学的染色

切片の載ったスライドを100%、90%、70%エタノールに5～10分ずつ浸し、脱ワックスした。この後、PBSに移し5～10分、TPBS中で30分以上静置した。ブロッキングは、3%BSA/PBSを用いて1時間以上、3%スキムミルク/PBSを用いた時は30分以上行った。1次抗体としてハイブリドーマ上清を30μlずつ切片上に滴下し、切片を湿潤箱中で2時間静置した。この後、ビオチニル化ヤギ抗マウスIgG抗体('StrAviGen B-SA kit' #295004; BioGenex)を滴下して1時間、β-ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジンを滴下して30分、酵素基質としてX-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranose)を滴下して発色させ、6時間後に蒸留水中に移して反応を止めた。抗原認識部位は明るい青色を呈した。なお、各ステップ間は、TPBSを3回以上取り替え、TPBS中での静置時間が合計30分以上になるようにして十分な洗浄を行った。陽性対照と陰性対照には、免疫マウスの血清と非免疫マウスの血清をそれぞれ100倍希釈して用いた。免疫染色を施した切片は、エタノールシリーズで脱水したのち、キシレンに通して、ビオライト(高研)で封入した。

<結果>

アフリカツメガエルは、年中、産卵が可能な動物であり、その卵巣中にはさまざまな卵形成段階の卵母細胞が存在する。このことは年1回産卵の無尾類にはみられない特徴であり、アフリカツメガエルの利点のひとつである。この利点を活かし、得られた抗体の選別

に、卵巣切片を用いることにした。1枚の切片に対して免疫染色することで、卵形成期の限られた時期にのみ発現する抗原や、限られた場所のみ発現する抗原を認識する抗体を選別することが可能にはずである。

卵巣は、比較的若い成体（体長約5cm）から摘出したものを用いた。これより若い場合では、卵形成期初期の卵母細胞ばかりで卵巣が構成されることになり、また、これよりさらに成熟すると卵形成期後期の卵母細胞に偏って構成される卵巣となるからである。用いた卵巣には各段階の卵母細胞が揃っており、実験目的に好適であった（図5A）。ただし、st. IIIとIVの卵母細胞が極端に少ない場合があった。これは、これらの時期が卵形成期を通して最も成長の速い時期である（Callen et al., 1980a）ことを反映しているものと思われた。

卵巣の固定を、ホルマリン固定、エタノール固定、メタノール固定、アルデヒド固定など複数の条件で試した結果、10%中性緩衝ホルマリンによる6時間以上の固定が、もっとも抗体染色時のバックグラウンドが低く、切片作製時の組織剥落も少ないことがわかった。また、卵母細胞の細胞質にある卵黄は、抗体と非特異的に吸着しやすく、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、免疫染色時にはまずTPBSでよく洗浄したのち、3%スキムミルク（または3%BSA）でブロッキングを行ったときのみ、その吸着を抑えることができた。免疫染色は、2次抗体以降をビオチン-ストレプトアビジンの増感系で感度をあげた。また、発色系としては、自家発色がない β -ガラクトシダーゼ-X-galを用いた。

免疫染色の結果、465個のハイブリドーマ上清のうち、10個

が特定の段階の卵母細胞を染色した。これらの認識する抗原は、時期特異的に発現して蓄積する、またはその発現量が時期特異的に極端に変化して蓄積することが考えられた。この時期特異性は2種類あり、卵形成期初期に強く現れるもの (type E) と卵形成期後期に強く現れるもの (type L) があった (図6、表1)。

465個のハイブリドーマ上清のうち22個は、卵母細胞の特定の部域を染色した (表2、図7)。これらの認識する抗原は、ある部域にのみ蓄積する、もしくは量の上で極端な勾配を持って蓄積する抗原であろうと思われた。この分布特異性抗原は、卵形成期の st. V - VI における分布状態から4種類に分類でき、それぞれを認識する抗体群を type A, type V, type P, type N と名付けた。type A 抗体は、動物半球 (= Animal) に偏って存在する抗原を認識する。この抗原は、卵形成期の初期～中期 (st. I ~ III) には一様に分布するが、後期 (st. IV ~ VI) には動物半球に特異的な分布特性を示した (図7B)。type V 抗体は、植物半球 (= Vegetal) に偏って存在する抗原を認識する。この抗原は、卵形成期の初期～中期には均一に分布するが、後期には植物半球に特異的な分布特性を示した (図7C)。type P 抗体は、細胞質の卵膜周縁部 (= Peripheral) に偏って存在する抗原を認識する。この抗原は、初期から後期まで検出され、常に卵母細胞膜周縁に分布していた (図7D)。これら3群の抗体は、いずれも細胞質を認識する抗体であったが、全ての時期で卵黄顆粒を染めることはなかった。また、卵形成期初期 (st. I) に見られるミトコンドリア・マスや、リボゾーム集合体などを染めることもなかった。

一方、type N 抗体は、卵の細胞質ではなく核質 (= Nucleoplasm)

を特異的に認識した（図 7 E）。この type N 抗体は、初期から後期まで全ての卵母細胞の核質を染めたが、卵巢切片上にみられる赤血球、血管内皮細胞、卵巢壁繊維芽細胞などの核質を染めることはなかった。生殖細胞特異的な核質タンパク質としてはヌクレオプラズミン（分子量 30 kD；Krohne and Franke, 1980）があるが、ウェスタン・ブロッティング（方法は 3.2 節）により確かめられた抗原分子量からは、ES-107, ES-113, ES-179 抗体のいずれもが、ヌクレオプラズミンとは違う核質タンパク質を認識していることを示した。

< 考察 >

モノクローナル抗体を多数作製し、それを ELISA 法、免疫組織化学的染色法の二つの方法で選別した結果、時期特異的抗原認識の抗体 10 個と分布特異的抗原認識の抗体 22 個を得ることができた。時期特異的抗原認識の抗体は、type E, type L の 2 群に分けられ、前者は卵形成期前半（st. I - III）の、後者は卵形成期後半（st. IV - VI）の卵母細胞の細胞質を特異的に認識した。分布特異的抗原認識の抗体は、type A, type V, type P, type N の 4 群に分けられ、前二者は卵形成期初期においては細胞質の全域を認識したが、中期以降（st. IV - VI）に部域性が現れた（図 8）。一方、後二者は卵形成期をとおして、常に部域性を示し続けた（図 8）。これらの結果は、タンパク質の蓄積パターンが st. III と st. IV を境に変わる様子を示している。

極性分布を示す type A, type V の抗体群は、st. IV 以降の卵母

細胞に限って極性分布の抗原認識を示したが、st. IV以降は卵黄顆粒や色素顆粒が極性分布を示すようになる時期でもある (Dumont, 1972)。なお、ミトコンドリア・マスやリボゾーム集合体の局所的な配置などから st. I の卵母細胞における極性の存在が報告されているので (Tourte et al., 1981)、こうした早い時期における極性を示す細胞質抗原の存在も期待されたが、今回の解析では得られなかった。St. IV以降に現れる卵母細胞の動植物軸性の起源については、卵巣壁との位置関係や初期卵母細胞に見られる極性とは無関係に形成されており (Hausen and Riebesell, 1991)、細胞内輸送の中心である中心体のある位置が植物半球側になる (Danilchik and Gerhart, 1987)。すなわち、卵母細胞の動植物軸は、卵黄タンパク質の急速な取り込みによって形成されるもので、この他の構造物 (卵核胞やリボゾーム、色素顆粒) は内部に急速に蓄積する卵黄顆粒に押しやられた結果として、極性分布を示すようになるらしい。しかし、本研究で得られた抗原の分布については、動物半球、植物半球のいずれに対しても特異的分布を示す抗原認識の抗体が得られており、このような「卵黄顆粒に押しやられて」という機構だけでは説明できないように思われた。

卵及び卵母細胞においては、細胞内骨格分子の極性分布が知られている。例を上げると、微小管 (Gall et al., 1983; Elinson and Rowning, 1988; Gard, 1991)、アクチン (Colombo et al., 1981)、サイトケラチン (Klymkowsky et al., 1987)、ビメンチンとデスミン (Nelson and Traub, 1982; Franz et al., 1983) などである。しかし、知られている範囲で比較した結果、こうした細胞内骨格分子の分布と本研究で得た抗体の認識部位とは、一致しなかった。従

って、細胞内骨格分子が抗原分子の極性分布に直接関わる可能性は低いものと思われた。但し、細胞内骨格の卵形成期における分布状態や機能については不明の点も多く、今後、両者の解析が進むことによって関係が明らかになる可能性も充分にある。

なお、特異分布抗原認識の抗体の中には、ろ胞細胞の細胞質中の抗原を認識するものがあった(表2)。このことは卵母細胞とろ胞細胞、それぞれの細胞質に共通の抗原が存在することを意味する。もし、これがろ胞細胞から卵母細胞への抗原の移動を示すものであれば興味深い。ろ胞細胞とは起源が異なるものの、哺育細胞を卵母細胞の周囲に持つ動物では、母性の発生制御因子の存在が示されているからである。例えば、軟体動物のモノアラガイ (*Lymnaea*) においては、螺旋卵割の向きが哺育細胞の配置に支配されていること (Wilson, 1904)、キイロショウジョウバエの前後軸決定遺伝子の発現は哺育細胞によって支配されていること (Frey et al., 1984) などである。また、卵母細胞-ろ胞細胞の細胞間連絡はよく発達しており (Dumont and Brumett, 1978)、成熟卵母細胞の持つ卵黄タンパク質の96%までがろ胞細胞を経由して蓄積したものであることも知られている (Danilchik and Gerhart, 1987)。従って、初期発生に重要な働きを持つ因子がろ胞細胞から運ばれて卵母細胞の細胞質中に極性を持って蓄積することは、考えられることである。今後、卵母細胞を囲むろ胞細胞の配置による働きの違いや、そのタンパク質合成の違いなどを明らかにできれば、こうした可能性について、一層の解明ができるものと思われた。

3.1 はじめに

第 2 章で述べたように、本研究では、卵細胞質の抗原を個別に認識できる多くのモノクローナル抗体が得られた。なかでも、分布特異性を示す抗体が 22 個取れたのは、序論で述べた第 1 の目的をほぼ達成するものであった。しかし、これらの認識する抗原が、果してタンパク質であるのかどうかはまだ不明である。また特異的な抗原の分布は、果して真に量的な差を見ているのか、それとも抗原性の露出 (Accessibility) の違いを見ているのかも不明である。

本章では、まず、ウェスタン・ブロッティングで個々の抗体の認識分子を同定し、糖認識の疑いが強い抗体を除いた後、分布特性が固定のアーティファクトでないこと、脱ろ胞化した卵母細胞でも同様の分布特性が認められることを確認した。そして卵母細胞の 2 断片から抽出したタンパク試料を用いてウェスタン・ブロッティングを行い、やはり動植物軸性を示すことを証明した。また、動植物軸に沿って特異的な分布を示す type A 抗原と type V 抗原は、その分布領域の違いから、それぞれ A_1 , A_2 , V_1 , V_2 とさらに分けることができた。

一部の抗体については、胞胚期を用いて、初期発生における抗原分布の様子を調べた。その結果、胞胚期においても卵母細胞でみられた極性が変わらない抗原があることがわかった。

3.2 分布特異性抗原の選別

<材料と方法>

タンパク試料の調製

前卵黄形成期の卵母細胞は、体長約7cmの成体から卵巣を摘出し、コラゲナーゼ処理を行ったのち、網の目が200 μ mのナイロン網を用いたサイズ別選別により集めた。未受精卵のS100分画は、体長7cmの成体から人工産卵により採取した未受精卵を脱ゼリー処理した後、2/3希釈PBS中に移し、105,000 \times g、70分の遠心を行って得た。卵巣のS100分画は、体長約7cmの成体から摘出した卵巣を2/3希釈PBS中で洗浄して、細切した後、105,000 \times g、70分の遠心を行って得た。

ウェスタン・ブロッティング

タンパク試料をSDS-PAGEの2倍濃度のサンプル緩衝液と等量混和して泳動試料溶液とした。SDS-PAGEは10%ゲル濃度のミニゲルでLaemmli(1970)の方法に従って行なった。ゲル上面の井戸は7cm幅に作製し、300 μ g/150-200 μ lに調製したタンパク試料を1度に泳動した。

泳動後は、Kyhse-Andersen(1984)の方法で、セミドライエレクトロブロッター(#SM175-56; Sartorius)を用いて、ゲルからニトロセルロース紙(#401-099; Schleicher & Schuell)へとタンパク質を電氣的に転移した(Towbin et al., 1979; Renart et al., 1979; Burnette, 1981)。ニトロセルロース紙は必ず2枚重ねて転

移を行い、ゲルに密着させた方をPBSでよく洗い、以後の免疫染色に用いた。保存する際は、0.01～0.02%アジ化ナトリウム/PBS中で、4℃に置いた。なお、もう1枚のニトロセルロース紙はTPBSで十分に洗浄した後、アミドブラック染色(Reisner et al., 1975)、または金コロイド染色(#170-6527; Bio-RAD)により、全タンパク染色を施し、転移が全面で充分に行われたかどうかの確認を行うのに使った。また、残ったポリアクリルアミドゲルもクマシーブリリアントブルー染色によりタンパクの全染色を行い、最初の電気泳動が正常に行われたかどうかの確認と、転移が全面で充分に行われたかどうかの確認に用いた。

ニトロセルロース紙は縦方向に短冊状に切断し、各短冊ごとに違う抗体を用いることができるようにした。3%BSA/PBS、または3%スキムミルク/PBSで1時間ブロッキングを行った後、ハイブリドーマ上清を1次抗体液として滴下して2時間静置、この後、ビオチニル化ウサギ抗マウスIgG(H+L)抗体(#61-6540; Zymed)を滴下して1時間、 β -ガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン(#43-4321; Zymed)を滴下して30分、X-galを滴下して6時間以上おいて発色させた。各ステップ間は、TPBSを3回以上取り替え、TPBS中での静置時間が合計30分以上になるようにし、十分な洗浄をおこなった。陽性対照と陰性対照には、免疫マウスの血清と非免疫マウスの血清を100倍希釈して用いた。充分に発色したニトロセルロース紙断片は、蒸留水中に移して発色を停止し、風乾した。

< 結果と考察 >

2.4節において、卵母細胞の細胞質中に特異的分布を示す抗原を認識すると思われるモノクローナル抗体19個を選別した(type A, type V, type P)。そこで、これらが認識する分子量を同定するため、ウェスタン・ブロッティングによる解析を行った。タンパク試料には、それぞれの抗体作製時に用いた免疫抗原を用いた。すなわち、PVシリーズのモノクローナル抗体に対しては、前卵黄形成期の卵母細胞を、ESシリーズのモノクローナル抗体に対しては、未受精卵S100分画をタンパク試料としたウェスタン・ブロッティングによる解析を行った。結果として、はっきりとした認識分子を示した抗体、認識分子を示さなかった抗体、スメアなバンドパターンを示した抗体の3種類があった。

はっきりとした認識分子を示した抗体は、9個(PV-21, PV-83, ES-5, PV-13, PV-46, PV-88, ES-24, ES-41, ES-82)あった。これらはタンパク質を認識する抗体である可能性が非常に高い。ただし、複数の分子を認識するものも含まれた。これについては、特定の修飾構造を認識する抗体である可能性や、抗原に複数の派生分子、または前駆分子がある可能性を意味している。次に、認識分子を特定できなかったモノクローナル抗体については、①タンパク試料中の認識分子の量が少ないため検出されなかった、②ウェスタン・ブロッティングの過程で行われたタンパク変性により抗原性が失われてしまった、などの可能性が考えられた。①については、タンパク試料を換えることで解決できる場合もあると考え、卵巣S100分画をタンパク試料としたウェスタン・ブロッティングを全ての抗体に

対して行った。この結果、認識分子を特定できるモノクローナル抗体の数が増した。②の可能性は、タンパク質の高次構造を認識する抗体の場合に該当する。しかし、解像度のよい電気泳動を行うためには、SDS変性は不可避であったため、回避策は行わなかった。最後にスメアなバンドパターンを示した抗体は7個あった。これらは糖を認識する抗体である可能性が非常に高い。そこで、これらの抗体は本研究の目的に沿う抗体ではないと考え、以降の解析には用いないことにした。結局、はっきりと認識分子を特定できたモノクローナル抗体と認識分子を特定できなかったモノクローナル抗体を残すことにした(表3)。

ウェスタン・ブロッティングの結果、選別された各抗体の認識分子の分子量は、表2に示した。なお、上述した選択の結果、認識分子の分子量は45~70kDの範囲に集中した。抗原として用いた前卵黄形成期卵母細胞、未受精卵S100分画、卵巢S100分画に含まれるタンパク質の構成にはこうした偏りが無い(図4参照)ことから、この認識分子量の偏りは、次の様な可能性が考えられた。

- ① 45~70kDには免疫されやすい分子が多い。
- ② 45~70kDにはタンパク変性処理によっても抗原性を失わないものが多い。
- ③ 45~70kDには分布特異性抗原が多い。これらの可能性についてはそれぞれ興味深く思われた。

3.3 分布特異性抗原の極性について

<材料と方法>

成熟卵母細胞の2分断片に対するウェスタン・ブロッティング

十分に成熟した成体（体長約7cm）から卵巣を摘出し、2.2節の「卵母細胞の調製」で述べた方法で、コラゲナーゼ処理を行い卵母細胞を解離した。脱ろ胞化した卵母細胞は、即座にドライアイス-アセトン中で凍結し（15-30秒間）、その後、-20℃のメタノールに移して固定した（10-20分）。

実体顕微鏡下で、固定された卵母細胞のうち成熟卵母細胞を選別し、剃刀で動物側半球と植物半球側に2分した。各半球の断片は5個1組としてエッペンドルフチューブに集め、10分間の真空遠心によりメタノールを除去した。これに0.1% SDS溶液100 μ lを添加して10分間、0.1% SDS-5% NP40溶液100 μ lを添加して10分間の懸濁を行った。この後、卵黄成分沈殿のため、10,000 \times g、5分間の遠心を行い、上清（ \sim 200 μ l）をタンパク質試料とした（Smith, 1986）。

動物半球側、または植物半球側の断片から抽出したタンパク質試料は、それぞれSDS-PAGEの2倍濃度サンプル緩衝液と等量混和して泳動試料とした。SDS-PAGEは10%または12%ゲル濃度のミニゲルを用い、Laemmli（1970）の方法で行った。ゲル上面の井戸は7cm幅に作製し、2枚のゲルに泳動試料をそれぞれ200 μ l（各半球の断片2.5個分）ずつ泳動した。泳動後は、セミドライエレクトロブロッター（#SM175-56, Sartorius）を用いて、

ゲルから P V D F 膜 (Polyvinylidene difluoride; #IPVH-304-F0, "Immobilon"; Millipore) へとタンパク質を転移した (Gultekin and Heermann, 1988)。P V D F 膜は必ず 2 枚重ねて転移を行い、予備の P V D F 膜と転移後のポリアクリルアミドゲルは 3.2 節の「ウェスタン・ブロッティング」で述べた方法で転移の確認を行うのに用いた。試料用の P V D F 膜は、0.01 ~ 0.02 % アジ化ナトリウム / トリス緩衝溶液 (T B S) 中で、4 °C で保存した。

P V D F 膜は縦方向に短冊状に切断し、各短冊ごとに違う抗体を用いることができるようにした。0.05 % ツイーン 20 / T B S 溶液 (T T B S) で洗浄し、同溶液中で 15 分間静置した後、1 % ブロッキング溶液で 1 晩のブロッキングを行った。翌日、T T B S で 2 時間以上の洗浄を行った後、1 次抗体としてハイブリドーマ上清を滴下して 2 時間静置、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス I g G + A + M 抗体 F (ab')₂ 分画 (#61-6322; Zymed) を滴下して 1 時間静置、増感系としてアルカリフォスファターゼ標識抗アルカリフォスファターゼ抗体 (#80-6522; Zymed) を滴下して 1 時間おいた (Cordell et al., 1984)。各操作の間には、T T B S による十分な洗浄を行った。最後に、アルカリフォスファターゼ緩衝液 (A P 緩衝液; 0.1 M Tris-buffered saline, pH 9.4, 50 mM MgCl₂) でよく洗浄の後、100 μg / ml の A M P P D [3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane; Tropix, Inc.] / A P 緩衝液で 30 分間ソーキングを行い、各短冊をナイロン袋に封入して、X 線フィルムと密着して感光させた (Brönstein et al., 1989)。陰性対照には、本研究室の小原と河原が作製したマウス抗アフリカツメガエル血清アルブ

ミンモノクローナル抗体を用いた。

脱ろ胞化した卵母細胞に対する免疫組織化学的染色

卵母細胞は、2.2節の「卵母細胞の調製」で述べたコラゲナーゼ処理により、卵巢から解離して集めた。卵母細胞の段階別選別は、3回のナイロン網を用いたサイズ別選別により行った(図9)。最初は、Kawahara's CMF 中で目のサイズが200 μ mのナイロン網('Nytal', #7XX-200; Swiss Silk Bolting Cloth)を用いて選別した。小ピーカーの底面に抜けたのは、直径が最大で300 μ mの卵母細胞で前卵黄形成期(st. I)の卵母細胞であった。一方、200 μ m網を抜けられずに円筒内部に残った卵母細胞は、さらに300 μ m網('Nytal', #58GG-300; Swiss Silk Bolting Cloth)で2度目の選別を行った。300 μ m網を抜けられた卵母細胞は、直径が約300~450 μ mのst. IIの卵母細胞であった。300 μ m網を抜けられずに円筒内部に残った卵母細胞は、さらに400 μ m網('Nytal', #45GG-400; Swiss Silk Bolting Cloth)で3度目の選別を行った。400 μ m網を抜けられたのは、直径が約450~600 μ mのst. IIIの卵母細胞であり、網を抜けられずに円筒内に残ったのは、直径が600 μ m以上の卵黄形成期後半(st. IV - VI)の卵母細胞であった。

サイズ別に集められた卵母細胞は、それぞれPBS中で洗浄の後、2.4節の「免疫組織化学的染色」で述べた方法で、固定、包埋、薄切し、スライドガラス上に伸展した後、免疫組織化学的染色を施した。

卵巣切片の作製と免疫組織化学的染色

十分に成熟した成体（体長約7cm）から卵巣を摘出し、2.4節の「免疫組織化学的染色」で述べた方法で、固定、包埋、薄切して、スライドガラス上に伸展した後、免疫組織化学的染色を施した。

< 結果 >

タンパク質性抗原を認識すると期待できるモノクローナル抗体のうち、卵の細胞質に特異的な分布を示す抗体12個（type A, type V, type P）を用いて、その抗原についての解析をさらに行った。まず、特異的分布が固定のアーティファクトでないことを確認するため、2.2節で用いた卵巣を違う固定液、違う条件で固定して免疫組織化学的染色を行った。その結果、エタノール固定の時には、固定時間の長短に関わらず、特異的分布状態が確認しにくくなる結果となったが、冷メタノール固定、5%グルタルアルデヒド固定では、同様の分布状態が得られた。従って、これらモノクローナル抗体の示した抗原の分布特性については、固定時のアーティファクトである可能性はないものと考えられた。

次に、これらモノクローナル抗体の示す分布特性が、果して抗原分布を示すのかどうかを確認するために、成熟卵母細胞を2分割してそれぞれから抽出したタンパク試料を用いてウェスタン・ブロッティングによる解析を行った（図10、表4）。その結果、ほとんどの抗体で、領域性が検出され、それが2.4節で求められた領域性の結果と矛盾しなかった。従って、モノクローナル抗体が切片上で示した分布特性は、抗原の分布そのものの偏りを示すものであるこ

とが強く示唆された。これにより、抗原が部域特異的に周囲の別な高分子により抗体との接触を封じられている可能性を除外することができた。

3番目に各段階の卵母細胞に対する免疫組織化学的染色による解析を行なった。この解析は、卵巢を用いて行った免疫組織化学的染色の解析で得られた結果の確認のために行われたもので、卵母細胞の発生段階を形態的特徴ではなく、大ききで分けて行った。卵母細胞はコラゲナーゼ処理により脱ろ胞化して、ナイロン網でサイズ選別をし、st. I、st. II、st. III、st. IV - VI、の4群にわけて集め(図9)、それぞれを個別に固定し、包埋、薄切ののち、免疫組織化学的染色に用いた。この解析の結果、卵巢を用いて免疫組織化学的染色を行って得られた結果と同様の結果がいずれの抗体を用いても得られることが判明した。なお、type A抗体とtype V抗体は卵黄形成期後半(st. IV - VI)の卵母細胞においてのみ分布特性を示し、st. IV以降に抗原の極性分布が始まることを示した。St. IV以降は卵母細胞にはっきりとした動植物極性が卵黄、色素顆粒、卵核胞の極性分布によって現れてくる時期であり、従来知られていた卵の軸性形成と関係があることを思わせた。また、脱ろ胞化した卵母細胞を用いたことで、卵母細胞細胞質の周縁部の観察が容易で、type P抗体が卵母細胞膜直下の部分、すなわち、色素顆粒が存在し、卵黄顆粒が存在しない細胞質部分を染めていることがわかった(図11)。この細胞質部分は卵母細胞の全面にわたって存在するが、動物半球側にやや厚く、植物半球側にやや薄く存在しており、type P抗体の染色部位もそれにしたがって、動物半球側にやや厚めに存在していることがわかった。

なお、脱ろ胞化した卵母細胞に対する免疫組織化学的染色の結果と、卵巣中の卵母細胞に対する免疫組織化学的染色の結果を比較することにより、ろ胞を染色する傾向を示した抗体、PV-83, ES-78, PV-41, ES-5, ES-41, ES-61, ES-82 のいずれもが、前卵黄形成期の卵母細胞を取り囲むろ胞細胞のみを認識していることがわかった(表4)。

最後に充分成熟した成体(経産個体)から摘出した卵巣を用いて連続切片を作製して、免疫染色を行い、各モノクローナル抗体の成熟卵母細胞における抗原認識部位を詳細に調べた。成熟個体の卵巣はst. IV - VIの卵母細胞が多く、成熟卵母細胞における抗原の分布状態を観察するのに都合がよかった。この解析の結果、type A抗体とtype V抗体の認識部位を立体的に理解することができ、それぞれの認識部位の特異性から、type A抗体がtype A₁, A₂の二つに、type V抗体がtype V₁, V₂の二つにさらに分類できることがわかった(図12、表4)。type A₁は抗体PV-21, PV-83, ES-78から構成された。これらは赤道面よりも上側の動物半球細胞質のほぼ全域に存在する抗原を認識しており、抗原分布は植物半球側に向けて徐々に減少する傾向が認められた。type A₂は抗体PV-41, ES-5から構成され、動物半球の卵細胞膜付近の狭い範囲の細胞質に存在する抗原を認識していた。type V₁は抗体PV-13, ES-24から構成され、赤道面よりも下側の植物半球細胞質のほぼ全域に存在する抗原を認識していた。type V₂は抗体PV-46, PV-88から構成され、植物半球から卵核胞の周囲にかけての細胞質に円筒状に存在する抗原を認識していた。これらの分布の境界は、はっきりとしており、卵黄の分布などとは、明らかに異なる状態を示した。

< 考察 >

本節では、まず、抗原の極性分布が固定のアーティファクトでないこと、脱ろ胞化した卵母細胞でも同様の分布特性が認められることを確認した。そして卵母細胞の2分断片から抽出したタンパク試料を用いてウェスタン・ブロッティングを行い、やはり動植物軸性を示すことを証明した。また、動植物軸に沿って特異的な分布を示す type A 抗原と type V 抗原は、その分布領域の違いから、それぞれ A_1 , A_2 , V_1 , V_2 とさらに分けることができた。

これらの結果は卵母細胞の細胞質中にはっきりとした極性分布をもつタンパク質が存在することを明らかにした。この極性分布は、2.4節でも述べたとおり、卵黄顆粒や色素顆粒、リボゾーム集合体、さまざまな細胞内骨格分子の分布とは一致せず、これらとの直接の関係は無いものと考えられた。それでは、どのような機構がタンパク質の極性分布を形成するのであろうか。可能性としては次のふたつを考えることができる。①タンパク質の合成と代謝のバランスが局所的に変化することで、こうした極性分布が生じる。②mRNAがあらかじめ極性分布をしているとその翻訳物であるタンパク質も極性分布されやすい。これらの可能性の是非については Smith (1986) が卵母細胞の動物半球と植物半球から mRNA をそれぞれ抽出し、*in vitro* の翻訳系を用いて実験を行い、動植物軸に沿ったタンパク合成量の勾配は、mRNA の極性分布を反映していると結論し、上の②の可能性を支持している。事実、いくつかの mRNA (Melton, 1987 の An-1, An-2, An-3, Vg-1; Kloc et al., 1989 の xlgv-7)

は極性分布をしており、poly(A)⁺RNAの分布自体も植物半球の表層近くに限定されている (Capco and Jeffery, 1982)。従って、タンパク質の極性分布は、こうしたmRNAの極性分布を反映したものとみなすことが可能である。一方、卵母細胞の細胞質に極性分布している細胞内骨格分子はmRNAと結合することができることから (Jeffery, 1984, 1989; Fey et al., 1986; Lawrence and Singer, 1986)、こうしたmRNAの極性分布に関与している可能性が高い。すなわち、細胞内骨格分子の極性分布が基となってmRNAが極性分布を形成し、これが翻訳されることでタンパク質の極性分布を生じているのかも知れない。但し、mRNAの分布パターンには、本研究で明らかになったタンパク質の分布パターン (type A₁, A₂, V₁, V₂, P) ほどのバリエーションが無いことから、翻訳後のタンパク質の移動や配置については、細胞内骨格分子や細胞内小器官の直接または間接的な関与が有り得るものと考えられる。

3.4 初期発生における分布特性

<材料と方法>

アフリカツメガエル成体雌に性腺刺激ホルモン投与して得た未受精卵に、雄精巣をPBS中で細切して作製した精子液を滴下し、人工受精を行った。桑実胚期後半(st. 6^{1/2} ~ 7)に2.5%チオグリコール酸ナトリウム溶液で脱ゼリー処理を行い、胞胚期中期(st. 8)の胚を10%中性緩衝ホルマリンで6時間以上固定した。切片作製と免疫組織化学的染色は、2.4節で述べた方法でおこなった。

<結果と考察>

卵母細胞の細胞質中に分布特性を示す抗体群のうち、type A₁抗体のPV-21、type A₂抗体のPV-41、type V₁抗体のPV-13の3つの抗体をつかって、初期胚における分布を調べた。初期胚は人工受精により発生させた胞胚を用いた。この結果、いずれの抗体も卵母細胞において示したのと同様、動植物軸性に沿った部域性を維持していた。それぞれの特徴は、次の通りである。①PV-21抗体：動物半球側割球への偏った部域性を示すとともに各割球の周縁の細胞質を強く染めた(図13A)。②PV-41抗体：動物半球側割球への偏った部域性を示したが、同時に植物半球側割球の核、及び核周辺にも認識する抗原があることを示した(図13B)。③PV-13抗体：植物半球側割球への偏った部域性を示し、特に植物極付近の細胞質を濃く染めた(図13C)。

アフリカツメガエルの受精卵は第1卵割までに、表層下細胞質 (subcortical cytoplasm) が $t=0.3$ に精子陥入点周辺へ収縮運動を行い、 $t=0.45$ に植物半球側の大規模な回転運動を、 $t=0.75$ に動物半球側の小規模な回転運動をする (Vincent et al., 1986)。また、この間、細胞質が部分的に再配列すること (Neff et al., 1984; Danilchik and Denegre, 1991) が知られており、未受精卵および受精卵の倒置実験の結果 (Neff et al., 1983; Gerhart et al., 1981) と併せて、この受精期の細胞質運動が背腹軸を定めると考えられている。従って、PV-21、PV-41、PV-13抗体が背腹軸形成に関わっているとすれば、将来の背腹軸方向を反映するような領域性を示すことが期待されたが、現時点では確認できていない。むしろ、卵母細胞でみられた動植物軸性に沿った領域性がそのまま維持されており、こうした受精期にみられる細胞質運動の時期を経てもその領域性を維持し続けるタンパク質性因子であることを示唆した。また、その領域性から、頭尾軸形成に関わる可能性が高いものと思われた。

第 4 章 総括

本研究は、初期発生過程の理解のための研究の一環として計画され、卵母細胞の細胞質抗原に対するモノクローナル抗体を作製することから始まった。免疫に用いる抗原には、バルクではあるが卵黄の含まれていない状態の抗原が適しているとの考えから、前卵黄形成期の卵母細胞と、未受精卵の S 1 0 0 分画を用いた。これらの抗原を用いての免疫と細胞融合の操作の結果、モノクローナル抗体は、前者から 1 2 3 個 (P V シリーズ)、後者から 3 4 2 個 (E S シリーズ) を得ることができた。これら抗体の選別は、まず、免疫抗原に対する E L I S A (2.3 節)、そして卵巣切片に対する免疫組織化学的染色 (2.4 節) の順で行い、時期特異性を示す抗原認識抗体を 2 群 1 0 個 (表 1、図 6)、分布特異性を示す抗原認識抗体を 4 群 2 2 個 (表 2、図 7) 得た。

時期特異性抗体は、卵形成期の st. I - III に多く合成される抗原もあれば (type E)、st. IV - VI に多く合成される抗原もあること (type L) を示した。タンパク質合成活性は卵形成期を通して一様であり (Tayler and Smith, 1985)、選択的なタンパク質代謝が無いならば、鋳型の m R N A の構成が st. III / IV を境に変わることを意味した。一方、分布特異性抗体は、st. IV 以降、特定の部位に蓄積するようになる抗原があることを示した (type A, V)。分布特異抗原の極性分布は、3.3 節で考察したとおり m R N A の極性分布に依存している可能性が高い。従って、st. III または IV 以降、鋳型である m R N A が極性分布を示すようになったことを意味するものと考えられた。卵形成期を通して分布の明らかになって

いる mRNA である Vg-1 は、初期卵母細胞では一様に分布しているが、st. III 以降、植物極付近に極性分布をするようになる（図 14 A; Melton, 1987）。これらのことから、卵母細胞の内部において st. III / IV を境に mRNA の構成や配置が変わり、これを反映してタンパク質の消長や分布特性が現れるというスキームを描くことができる。このスキームの是非は、抗体をもとにその cDNA を得て、*in situ* ハイブリダイゼーションによる卵母細胞内の mRNA 分布を解析することで判定できるはずである。

分布特異性抗原を認識する抗体は、動物半球の細胞質を認識する抗体群（type A）、植物半球の細胞質を認識する抗体群（type V）、周縁の細胞質を認識する抗体群（type P）、核質を認識する抗体群（type N）の 4 群に分けられた。このうち、前者 3 群については、さらにウェスタン・ブロッティングの解析をして、糖鎖認識の疑いがある抗体を除外し、最終的に 12 個の抗体を選別した（3.2 節、表 3）。これらは、抗原認識において、細胞質中で分布特異性を示す抗体であり、成熟した卵母細胞の細胞質における分布特性から、type A₁, A₂, V₁, V₂, P とに分けることができた（3.3 節、図 12、表 4）。しかも、興味深いことに、これらの分布領域は、A₁ と V₁、A₂ と V₂ が、それぞれ相補的であり、あたかも境界線が二つ存在するかのようであった（図 15）。これら境界は、あくまでも抗原分布の上であられるものであり、構造として確認できるわけではない。従って、卵母細胞中での細胞質流動の境界を見ている可能性や、細胞質中での物質輸送の境界を見ている可能性などもありえるが、初期発生過程において発生調節因子が局在することの重要性から考えると、こうした境界を形成する未知の構造があることも考えうる。

いずれにせよ、分布特性が複数あり、それらの間にはっきりとした境界があるということは、新しい知見であり、大きな成果であった。以上の成果は、本研究の「卵形成期における細胞質性のタンパク質の蓄積パターンを明らかにする」という第1の目的を達成出来たことになり、「動植物軸にそった分布をしめす抗原の探求」という第2の目的も達成し得たと考えられる。また、3.4節で述べたとおり、これらの動植物軸に沿った分布を示す抗原の一部は胞胚期においてもその分布状態が維持されていた。これは、これらの抗原が頭尾軸形成に関わっている可能性を示したことのみならず、本研究で得た抗体が初期発生過程での研究にも利用できることを示した。

今後の課題は、本研究で明らかになった抗原の同定を進めることである。なによりも、初期発生においてどの様な機能を担っているかを解明することが第一であり、次に抗原の分子としての同定が必要になるであろう。未知の因子であれ、既知の因子であれ、分子としての同定が行われることで、研究は大きな展開を迎えることができるはずである。

体軸形成について最も解明されている実験動物は、現在の処、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) であろう。ショウジョウバエでは、卵形成期は3つに分けられ、順に形成細胞巢期、前卵黄形成期、卵黄形成期と呼ぶ(丸尾, 1989)。このうち、最初の形成細胞巢期は卵室形成の時期であり、ショウジョウバエ固有であるが、後者の二つは、アフリカツメガエルの前卵黄形成期、卵黄形成期に相当するものである。体制の軸性は、まず、卵黄形成期前半で頭尾軸が遺伝子 dic, bic, fs(1)K10 の発現により決定される。

つぎに卵黄形成期後半に遺伝子 dl-like, tud-like, tor-like の発現によって背腹軸が決定される (黒岩, 1987)。すなわち、ショウジョウバエの卵は成熟卵母細胞の段階ですでに軸性の二つともが決まっており、完全なモザイク卵である。軸性に関わる遺伝子や突然変異体は、すでに40以上も報告されているが (岡田, 1989)、なかでも発生開始前に発現する bcd⁺, nos⁺ の mRNA の濃度勾配と、発生開始まもなく形成される両遺伝子のタンパク質の濃度勾配が、頭尾軸形成に最も重要であるらしい。また、背腹軸形成については、Toll⁺ 遺伝子の局在性が、最も重要であるらしいこともわかっている (黒岩, 1989; Pankratz and Jackle, 1990)。

アフリカツメガエルにおいても、こうした体軸形成遺伝子をショウジョウバエの遺伝子をプローブにして探る試みが行われているが、まだ軸形成を促す決定的な遺伝子の解明はなされていない。アフリカツメガエルがショウジョウバエと異なる大きな点は、調節卵であるという点であり、背腹軸が発生開始後に定まる点である。すなわち、卵母細胞では、頭尾軸のみが決定しており、受精後、背腹軸が形成されるのである。Render と Elinson (1986) による巧妙な受精卵分離実験によると、この背腹軸形成は $t=0.5$ (受精後50分) までになされるらしい。一方、頭尾軸 (動植物軸) については、どの段階で形成されるかまだ判明していないが、本研究で得られた結果をもとに類推するならば、卵黄形成期後半、st. IV - VI の時期であろう。

本研究で得られたタンパク質の分布状態 (図12) と、すでに知られている mRNA の分布状態 (図14) を比較すると mRNA の方が極端な局在性、または急な勾配を示しているのがわかる。タン

パク質の極性分布についてはその仕組みが不明であるが、mRNAの極端な局在性に依存している可能性が極めて高いと考えられる。上述したショウジョウバエの bcd⁺ 遺伝子の発現パターンにおいては、極端な mRNA の勾配がもとになって、やや緩やかで広い範囲に及ぶ翻訳物の勾配ができることが指摘されており、それが頭尾軸形成に重要であるらしい (St. Johnston et al., 1989)。アフリカツメガエルでも頭尾軸形成遺伝子は bcd⁺ と同様、mRNA においては細胞内骨格分子などと結合して極端な濃度勾配を作り、タンパク質となつては自由拡散により緩やかな勾配を作つて細胞質に広く分布しているのかも知れない。

本研究は、初期発生の研究のために卵母細胞からスタートしたという点で例の無い研究である。ほとんど分画していない抗原を用いて、抗体を大量に作り、それを多段階のスクリーニングによって選別していくという点で、モノクローナル抗体作製の常道を外れるものであった。卵黄という免疫染色の際にすぐに非特異的吸着をおこしてしまう物質と正面からつきあわねばならない研究でもあった。こうして得た成果は、他の方法からは得ることのできない価値のあるものである。しかし、その成果から確定的にいえることはまだ少ない。その理由のひとつは、検出感度の問題であり、検出しようとする分子が有るのか、無いのか、どのような状態でそこにあるのかをはっきりとさせることが困難であるという、いわば免疫学的な手法を用いるかぎり、避け得ない技術的な限界である。もうひとつは、個々の抗原について、詳細が未検定のまま残されていることにある。前者については、今後、別なアプローチ、例えば分子遺伝学的な手

法を試みることでかなり解決されるであろう。また、後者については前述したように、初期発生過程に重きをおいて今後の研究を進めることで、展望できるようになるはずである。

金谷(1975)は、卵細胞についての総説のおわりに次のように述べている。「正常発生において卵が受精後発生し、個体として種特有の形態形成を行うときに、まずはじめにもっとも根本的な原因としてはたらくのは卵の極性もしくは卵構成成分の局在性(部域的差異)であろう。形態的にその内容物の分布などからまたしかに極性(もしくは部域的差異)は存在し、また卵表層にはウニなどで明らかかなように動物極から植物極にかけて、その生理的能力において極性が存在しているが、いったいこれはどの様にして構成されてくるのか? ある意味では形態形成機構の理解にとってもっとも重要なこの問題に関しては残念ながら何もはっきりしたことはわかっていないといってよい。」

本研究は、初期発生過程の理解のためのほんの一里塚である。しかし、この金谷の言葉と同じ問いかけを抱き、研究を遂行した結果、卵の中の極性分布物質の形成過程を判明できた。そして、今後の課題と展望などがはっきりとしてきたことは、本研究をさらに進める上で、大きな成果である。この実感をもって総括とする。

謝 辞

本研究は、1986年から1991年にかけて、広島大学総合科学部において行われました。この期間、天野實教授、渡邊一雄助教授、河原明助手に、終始、ご指導いただきました。実験の進め方や、結果の正当な評価の仕方を毎日のように教えていただく一方、セミナーやディスカッションで、広範な知識と情報を授けていただきました。心からお礼申し上げます。特に、私をのびのびと研究させてくださったことと、時折の励ましとご叱正をいただいたことに大変感謝しております。

本論文をまとめるに当たっては、広島大学生物生産学部の池上晋教授、理学部の嶋田拓教授、総合科学部の重中義信教授、宗岡洋二郎教授に、ハイブリドーマ作製については、生物生産学部の松田治男助教授に、クライオスタットとアフリカツメガエルの産卵用恒温室の利用に当たっては、総合科学部に1990年までおられた白根輝清助手にご教授いただきました。心よりお礼申し上げます。

最後に、研究生活を共にした天野研の皆さん、渡邊研の皆さんに感謝いたします。博士課程において良き討論の場となったレビューセミナーの皆さんに感謝いたします。総合科学部の事務の方々、とりわけ生物系事務の竹田朋子さんに感謝いたします。学費と生活費を工面して送り続けてくれた父と母、健康をつねに気遣ってくれた家内に感謝します。

引用文献

Bergink, E. W. and R. A. Wallace, (1974) Precursor-product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. *J. Biol. Chem.*, 249, 2897 - 2903

Brönstein, I., R. L. Cate, K. Lazzari, K. L. Ramachandran and J. C. Voyta, (1989) Chemiluminescent 1, 2-dioxetane based enzyme substrates and their application in the detection of DNA. *Photochem. Photobiol.*, 49, -

Burnette, A. N., (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195 - 203

Callen, J.-C., N. Dennebouy and J. C. Mounolou, (1980a) Kinetic analysis of entire oogenesis in Xenopus laevis. *Develop. Growth Differ.*, 22, 831 - 840

Callen, J.-C., M. Tourte, N. Dennebouy and J. C. Mounolou, (1980b) Mitochondrial development in oocytes of Xenopus laevis. *Biol. Cellulaire*, 38, 13 - 18

Capco, D. G. and W. R. Jeffery, (1982) Transient localizations of messenger RNA in Xenopus laevis oocytes. *Develop. Biol.*, 89, 1 - 12

Colombo, R., P. Benedusi and G. Valle, (1981) Actin in Xenopus development: indirect immunofluorescence study of actin localization. *Differentiation*, 20, 45 - 51

Cordell, J. L., B. Falini, W. N. Erber, A. K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K. A. F. Pulford, H. Stein and D. Y. Mason, (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complex). *J. Histochem. Cytochem.*, 32, 219 - 229

Danilchik, M. V. and J. M. Denegre, (1991) Deep cytoplasmic rearrangements during early development in Xenopus laevis. *Development*, 111, 845 - 856

Danilchik, M. V. and J. C. Gerhart, (1987) Differentiation of the animal-vegetal axis in Xenopus laevis oocytes. I. Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient. *Develop. Biol.*, 122, 101 - 112

Delaunay, J., M. Wegnez and H. Denis, (1975) Biochemical research on

oogenesis: Comparison between the proteins of the ribosomes and the proteins of the 42S particles from small oocytes of Xenopus laevis. Develop. Biol., 42, 379 - 387

Dilworth, S. M., S. J. Black and R. A. Laskey, (1987) Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in Xenopus egg extracts. Cell, 51, 1009 - 1018

Dumont, J. N., (1972) Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morph., 136, 153 - 180

Dumont, J. N. and A. R. Brummett, (1978) Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. J. Morph., 155, 73 - 98

Elinson, R. P. and B. Rowning, (1988) A transient array of parallel microtubules in frog eggs: potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. Develop. Biol., 128, 185 - 197

Feit, C., A. H. Bartal and Y. Hirshaut, (1984) Enhancement of hybridoma formation by addition of insulin to HAT medium (HIAT). Hybridoma, 3, 377 - 380

Fey, E. G., D. A. Ornelles and S. Penman, (1986) Association of RNA with the cytoskeleton and the nuclear matrix. J. Cell Sci., sup.5, 99 - 119

Franz, J. K., L. Gall, M. A. Williams, B. Picheral and W. W. Franke, (1983) Intermediate-size filaments in a germ cell: Expression of cytokeratins in oocytes and eggs of the frog Xenopus. P. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 6254 - 6258

Frey, A., K. Sander and H. Gutzeit, (1984) The spatial arrangement of germ line cells in ovarian follicles of the mutant dicephalic in Drosophila melanogaster. W. Roux Arch. Dev. Biol., 193, 388 - 393

Gall, L., B. Picheral and P. Gounon, (1983) Cytochemical evidence for the presence of intermediate filaments and microfilaments in the egg of Xenopus laevis. Biol. Cellulaire, 47, 331 - 342

Gard, D. L., (1991) Organization, nucleation, and acetylation of microtubules in Xenopus laevis oocytes: a study by confocal immunofluorescence microscopy. Develop. Biol., 143, 346 - 362

Gerhart, J., (1980) Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo. In: Goldberger, R. (eds.), 'Biological regulation and development.' 2, 136 - 316, Plenum Publ., New York

Gerhart, J., M. Danilchik, T. Doniach, S. Roberts, B. Rowning and R. Stewart, (1989) Cortical rotation of the Xenopus egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. Development, 107(s), 37 - 51

Gerhart, J., G. Ubbels, S. Black, K. Hara and M. Kirschner, (1981) A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in Xenopus laevis. Nature, 292, 511 - 516

Gimlich, R. L. and J. C. Gerhart, (1984) Early cellular interactions promote embryonic axis formation in Xenopus laevis. Develop. Biol., 104, 117 - 130

Gultekin, H. and K. H. Heerman, (1988) The use of polyvinylidene-difluoride membranes as a general blotting matrix. Anal. Biochem., 172, 320 - 329

Gurdon, J. B. and L. Wakefield, (1986) Microinjection of amphibian oocytes and eggs for the analysis of transcription. In: Celis, J. F., A. Graessmann and A. Loyter (eds.), 'Microinjection and organelle transplantation techniques.', 269 - 299, Alan R. Liss, New York

Hausen, P. and M. Riebesell, (1991) "The early development of Xenopus laevis: An atlas of the histology.", 1 - 142, Springer Verlag, New York

Jackle, H. and G. Eagleson, (1980) Spatial distribution of abundant proteins in oocytes and fertilized eggs of the Mexican Axolotl (Ambystoma mexicanum). Develop. Biol., 75, 492 - 499

Jeffery, W. R., (1984) Spatial distribution of messenger RNA in the cytoskeletal framework of ascidian eggs. Develop. Biol., 103, 482 - 492

Jeffery, W. R., (1989) Localized mRNA and the egg cytoskeleton. Int. Rev. Cytol., 119, 151 - 195

Kageura, H. and K. Yamana, (1983) Pattern regulation in isolated halves and blastomeres of early Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morph., 74, 221 - 234

Kageura, H. and K. Yamana, (1984) Pattern regulation in defect embryos of Xenopus laevis. Develop. Biol., 101, 410 - 415

Kageura, H. and K. Yamana, (1986) Pattern formation in 8-cell composite embryos of Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morph., 91, 79 - 100

Kawahara, A., K. Sato and M. Amano, (1981) Quantitative analysis of

protein synthesis altered by estrogen in cultured Xenopus liver parenchymal cell. *Develop. Growth Differ.*, 23, 599 - 611

Kloc, M., M. Miller, E. Carrasco, E. Eastman and L. Etkin, (1989) The maternal store of the xlgv7 mRNA in full-grown oocytes is not required for normal development in Xenopus. *Development*, 107, 899 - 907

Klymkowsky, M. W., L. A. Maynell and A. G. Poson, (1987) Polar asymmetry in the organization of the cortical cytokeratin system of Xenopus laevis oocytes and embryos. *Development*, 100, 543 - 557

Köhler, C. and C. Milstein, (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495 - 497

Krohne, G. and W. W. Franke, (1980) Immunological identification and localization of the predominant nuclear protein of the amphibian oocyte nucleus. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 1034 - 1038

Kusakabe, M., T. Sakakura, Y. Nishizuka, M. Sano and A. Matsukage, (1984) Polyester wax embedding and sectioning technique for immunohistochemistry. *Stain Technol.*, 59, 127 - 132

Kyhse-Andersen, J., (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, 203 - 209

Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 - 685

Lawrence, J. B. and R. H. Singer, (1986) Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell*, 45, 407 - 415

Masui, Y. and C. L. Markert, (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177, 129 - 146

Matsuda, H., M. Miyagawa, S. Iseki and M. Murata, (1985) Two serum glycoproteins in chickens inoculated with a transplantable Marek's disease cell line and preparation of monoclonal antibodies against the glycoproteins. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47, 879 - 888

Melton, D. A., (1987) Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of Xenopus oocytes. *Nature*, 328, 80 - 82

Moen, T. L. and M. Namenwirth, (1977) The distribution of soluble proteins along the animal-vegetal axis of frog eggs. *Develop. Biol.*, 58,

- Morgan, T. H., (1934) "Embryology and genetics." 9 - 10, Columbia Univ. Press, New York
- Nakane, P. K., (1975) Localization of hormones with the peroxidase-labeled antibody method. *Methods Enzymol.*, 37, 133 - 144
- Neff, A. W., G. M. Malacinski, M. Wakahara and A. Jurand, (1983) Pattern formation in amphibian embryos prevented from undergoing the classical "Rotation response" to egg activation. *Develop. Biol.*, 97, 103 - 112
- Neff, A. W., M. Wakahara, A. Jurand and G. M. Malacinski, (1984) Experimental analyses of cytoplasmic rearrangements which follow fertilization and accompany symmetrization of inverted Xenopus eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 80, 197 - 224
- Nelson, W. J. and P. Traub, (1982) Intermediate (10 nm) filament proteins and the Ca²⁺-activated proteinase specific for vimentin and desmin in the cells from fish to man: An example of evolutionary conservation. *J. Cell Sci.*, 57, 25 - 49
- Newport, J. and M. Kirschner, (1982a) A major developmental transition in early Xenopus embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*, 30, 675 - 686
- Newport, J. and M. Kirschner, (1982b) A major developmental transition in early Xenopus embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell*, 30, 687 - 696
- Nieuwkoop, P. D. and J. Faber, (1967) . "Normal Table of Xenopus laevis (Daudin) 2nd ed.." 1 - 243, North Holland Publ., Amsterdam
- Oakley, B. R., D. R. Kirsch and N. R. Morris, (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105, 361 - 363
- Pankratz, M. J. and H. Jackle, (1990) Making stripes in the Drosophila embryo. *Trends Genet.*, 6, 287 - 292
- Rebagliati, M. R., D. L. Weeks, R. P. Harvey and D. A. Melton, (1985) Identification and cloning of localized maternal RNAs from Xenopus eggs. *Cell*, 42, 769 - 777
- Reisner, A. H., P. Nemes and C. Bucholtz, (1975) The use of coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*,

Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark, (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. P. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 3116 - 3120

Render, J. A. and R. P. Elinson, (1986) Axis determination in polyspermic Xenopus laevis eggs. Develop. Biol., 115, 425 - 433

Rosbash, M. and P. J. Ford, (1974) Polyadenylic acid-containing RNA in Xenopus laevis oocytes. J. Mol. Biol., 85, 87 - 101

Sasse, J., (1987) Detection of proteins in gels. In: Ausubel, F. M., R. Bent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (eds.), 'Current protocols in molecular biology.', 10.6.1 - 10.6.3, John Wiley & Sons Inc., New York

Shulman, M., C. D. Wilde and G. Kohler, (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature, 276, 269 - 270

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk, (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem., 150, 76 - 85

Smith, R. C., (1986) Protein synthesis and messenger RNA levels along the animal-vegetal axis during early Xenopus development. J. Embryol. Exp. Morph., 95, 15 - 35

St. Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Richstein and C. Nusslein-Volhard, (1989) Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte. Development, 107(s), 13 - 19

Steedman, H. F., (1957) Polyester wax: A new ribboning embedding medium for histology. Nature, 179, 1345 -

Steward, M. and D. Male, (1989) Immunological techniques. In: Roitt, I., J. Brostoff and D. Male (eds.), 'Immunology 2ed.', 25.1 - 25.13, Gower Medical Publ., London

Swammerdam, J., (1668) 彼の死後、出版された 'Biblia Naturae' (1737) の記載によると、1668年頃、カエルの第1卵割や受精の様子を観察している。

Switzer III, R. C., C. R. Merrill and S. Shifrin, (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 98, 231 - 237

Taylor, M. A. and L. D. Smith, (1985) Quantitative changes in protein synthesis during oogenesis in Xenopus laevis. Develop. Biol., 110, 230 - 237

Tourte, M., F. Mignotte and J. -C. Mounolou, (1981) Organization and replication activity of the mitochondrial mass of oogonia and previtellogenetic oocytes in Xenopus laevis. Develop. Growth Differ., 23, 9 - 21

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon, (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. P. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350 - 4354

Ubbels, G. A., K. Hara, C. H. Koster and M. W. Kirschner, (1983) Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in Xenopus laevis eggs. J. Embryol. Exp. Morph., 77, 15 - 37

Viel, A., M. -J. Armand, J. -C. Callen, A. G. De_Gracia, H. Denis and M. le_Maire, (1990) Elongation factor 1 α (EF-1 α) is concentrated in the Balbiani body and accumulates coordinately with the ribosomes during oogenesis of Xenopus laevis. Develop. Biol., 141, 270 - 278

Vincent, J. -P., G. F. Oster and J. C. Gerhart, (1986) Kinematics of gray crescent formation in Xenopus eggs: The displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Develop. Biol., 113, 484 - 500

Wilson, E. B., (1904) Experimental studies in germinal localization. II. Experiments on the cleavage-mosaic in Patella and Dentalium. J. Exp. Zool., 1, 197 -

Woodland, H. R. and E. D. Adamson, (1977) The synthesis and storage of histones during the oogenesis of Xenopus laevis. Develop. Biol., 57, 118 - 135

Wylie, C. C., D. Brown, S. F. Godsave, J. Quarmby and J. Heasman, (1985) The cytoskeleton of Xenopus oocytes and its role in development. J. Embryol. Exp. Morph., 89(s), 1 - 15

Wylie, C. C., J. Heasman, J. M. Parke, B. Anderton and P. Tang, (1986) Cytoskeletal changes during oogenesis and early development of Xenopus laevis. J. Cell Sci., suppl. 5, 329 - 341

安東民衛, (1983) 単クローン抗体作製法. 「単クローン抗体:ハイブリドーマとELISA」, 30 - 143, 講談社

岡田益吉 (1989) 初期発生を支配する遺伝子 1. 体軸の決定., 「シリーズ分子

生物学の進歩 9. ショウジョウバエの発生遺伝学. (堀田凱樹、岡田益吉編)」, 159 - 172, 丸善

金谷晴男 (1975) 卵細胞., 「岩波講座 現代生物科学 4 発生. (太田行人、岡田節人編)」, 149 - 184, 岩波書店

黒岩厚 (1987) ホメオティック遺伝子とホメオボックス. 生化学, 59(2), 45 - 68

黒岩厚 (1989) 「ホメオボックス.」 1 - 278, 講談社

佐藤二郎, (1976) 細胞の保存法および輸送法., 「細胞培養. (中井準之助, 山根績, 山田正篤, 井上幸重, 堀川正克編)」 168 - 176, 朝倉書店

佐藤矩行、西田宏記, (1989) 細胞系譜を決めるもの 1. ホヤの場合. 「シリーズ分子生物学の進歩 8. 細胞コミュニティの形成. (竹市雅俊、藤沢肇編)」, 79 - 96, 丸善

佐藤矩行、景浦宏, (1989) 細胞系譜を決めるもの 2. カエルの場合. 「シリーズ分子生物学の進歩 8. 細胞コミュニティの形成. (竹市雅俊、藤沢肇編)」, 96 - 115, 丸善

澤田 健, (1983) ツメガエル卵母細胞の初期成長期におけるRNA及びタンパクの合成について. 広島大学総合科学部修士論文, 1 - 38

塩川光一郎, (1985) 「ツメガエル卵の分子生物学」. (UPバイオロジー, 56), 1 - 149, 東京大学出版会

増井禎夫, (1986) 染色体形成と細胞周期., 広島大学総合科学部生命科学セミナー

松橋 直, 成内秀雄, 臼井美津子 (1981) 「免疫学実験入門.」, 1 - 227, 学会出版センター

丸尾文昭 (1989) 正常発生過程の特徴 1. 正常発生の経過., 「シリーズ分子生物学の進歩 9. ショウジョウバエの発生遺伝学. (堀田凱樹、岡田益吉編)」, 7 - 40, 丸善

保井孝太郎, (1983) 単クローン抗体の検出法. 「単クローン抗体: ハイブリドーマとELISA」 144 - 183, 講談社

山名清隆 (1973) 発生過程におけるリボゾームRNA合成とその調節. 「現代の遺伝学 4 発生と分化.」, 23 - 84, 朝倉書店

Intensity of immunostaining in

Antigen	oocyte I	oocyte II-III	oocyte IV-VI	follicular cells	Molecular Weight
type E (early stage specific)					
PV-7	+	+			-
PV-11	+				-
PV-34	+	+			46, 45, 42, 36,
PV-53	++	+			45, 36, 35
ES-23	+	+			-
ES-37	++	+			-
ES-72	+	++			-
ES-83	+	+			-
type L (late stage specific)					
PV-39		+	++		51
PV-89		+	+		47

表1 時期特異的な認識を示す抗体

各抗体の前卵黄蓄積期 (st. I) の卵母細胞、卵黄蓄積期前半 (st. II - III) の卵母細胞、卵黄蓄積期後半 (st. IV - VI) の卵母細胞に対する染色の強さを示す。+は弱い、++は中間、+++は強い染色を示し、空欄は染色されなかったことを示す。なお、これらの抗体はいずれも卵細胞を染色することはなかった。一番右の列は、ウェスタン・ブロッティングによって同定された認識分子の分子量を示す。単位はk D。方法は3.2節の「ウェスタン・ブロッティング」の項を参照。

Antigen	Intensity of immunostaining in				Molecular Weight
	oocyte I	oocyte II-III	oocyte IV-VI	follicular cells	
type A (animal side cytoplasm-specific)					
PV-21	++	++	A	+	62, 46
PV-41	++	++	A		-
PV-83	+	++	+A		45
ES-5	+	+	A		59
ES-51	+N	+N	+A		-
ES-54	+N	+N	+A		-
ES-78	+	++	+A		59, 58, 52
ES-426	+	+	NA		-
ES-455	+	+	A		52
type V (vegetal side cytoplasm-specific)					
PV-12	+	+	V	+ -	47, 44, 36, 35
PV-13	++	+	V		50, 43, 31
PV-46	+	+	V		48, 45
PV-68	+	+	V	+	44
PV-88	+	+	V	+	42
ES-24	+	++	VP		75
ES-458	+	+	NV		-
type P (peripheral cytoplasm-specific)					
ES-41	P	+P	P		64
ES-61	P	+P	+P		-
ES-82	+P	+P	+P		70
type N (nucleoplasm-specific)					
ES-107	+N	+N	+N		54, 49
ES-113	+N	+N	+N		54
ES-179	+N	+N	+N		54

表2 分布特異的な認識を示す抗体

細胞質に極性分布する抗原を認識する3タイプの抗体 (type A, type V, type P) と核質を認識する抗体 (type N) をそれぞれ列挙した。各抗体の前卵黄蓄積期 (st. I) の卵母細胞、卵黄蓄積期前半 (st. II - III) の卵母細胞、卵黄蓄積期後半 (st. IV - VI) の卵母細胞に対する染色の強さを示す。+は弱い、++は中間、+++は強い染色を示し、空欄は染色されなかったことを示す。なお、これらの抗体若干が卵細胞を染色した。表中のアルファベットは、動物半球側に偏る (A)、植物半球側に偏る (V)、周縁の細胞質に偏る (P)、核質も染める (N) といった分布状態を示す。一番右の列は、ウェスタン・ブロッティングによって同定された認識分子の分子量を示す。単位はkD。方法は3.2節の「ウェスタン・ブロッティング」の項を参照。

type A	type V	type P
PV-21	PV-13	ES-41
PV-41	PV-46	ES-61
PV-83	PV-88	ES-82
ES-5	ES-24	
ES-78		

表3 ウェスタン・ブロッティングの解析によって選別されたモノクローナル抗体。

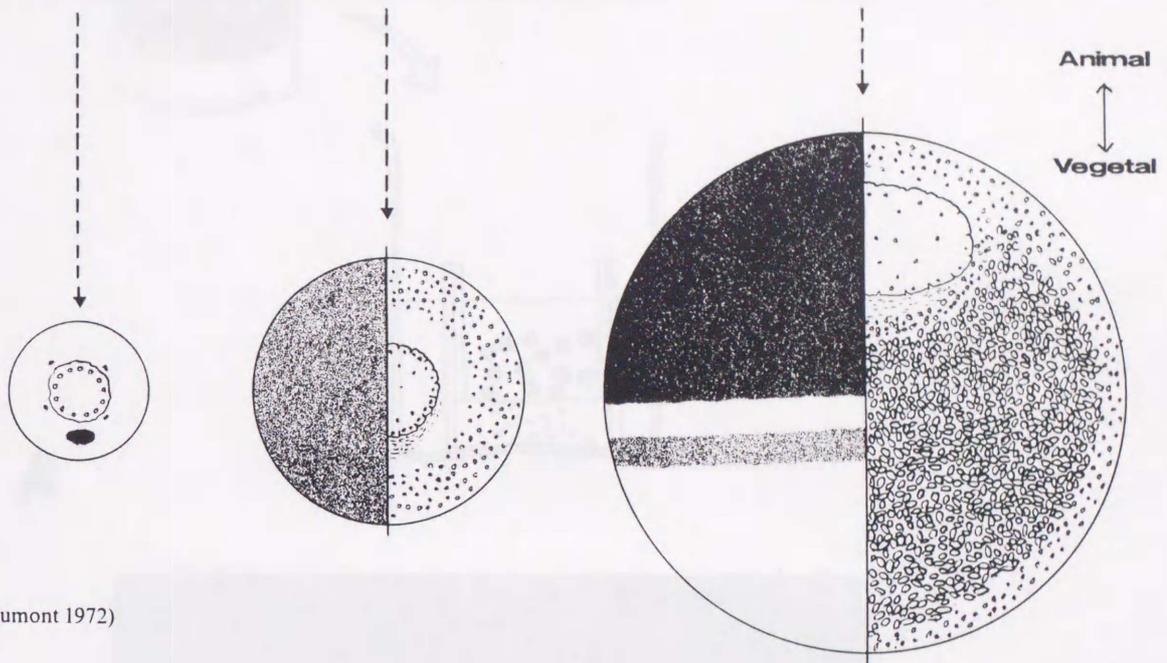
表2の19種のモノクローナル抗体 (type N 抗体をのぞく) が、ウェスタン・ブロッティングの解析によって12種までに選別された。

Antibody	Immunostaining <u>in situ</u>			Western blotting (kD)	
	oocyte I	oocyte II-III	oocyte IV-VI	oocyte animal half	oocyte vegetal half
type A ₁					
PV-21	+	++	++	(44, 40, 38)	(66, 46)
PV-83	+(F)	++	+	n.d.	(66)
ES-78	+(F)	++	++(N)	48	(48)
type A ₂					
PV-41	+(F)	++	++	n.d.	n.d.
ES-5	+(F)	+	++	38	n.d.
type V ₁					
PV-13	++	+	+++	n.d.	>200
ES-24	++	++	+	n.d.	>200
type V ₂					
PV-46	++	+	+++	(94)	64 - 65
PV-88	+	+	+++	n.d.	>200
type P					
ES-41	+(F)	++	+	n.d.	n.d.
ES-61	+(F)	++	+	47	75, 47
ES-82	+(F)	++	+		ca. 200, ca. 150 77, 47

表4 分布特異性抗原の消長と分子量

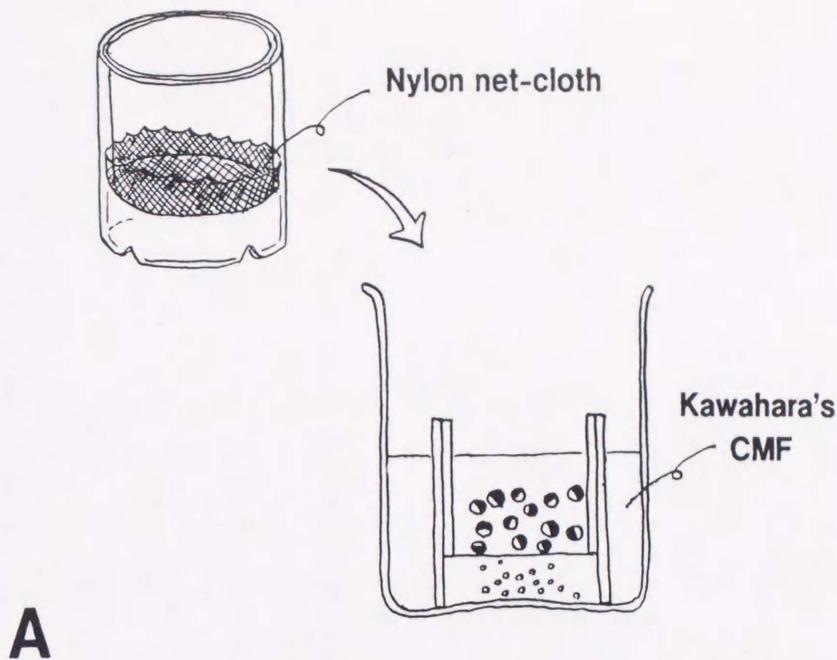
細胞質に極性分布する抗原を認識する抗体を各タイプ別にわけて抗原認識の消長と分子量を示す。前卵黄形成期 (st. I) の卵母細胞、卵黄形成期前半 (st. II - III) の卵母細胞、卵黄形成期後半 (st. IV - VI) の卵母細胞に対する染色の強さで示す。+は弱い、++は中間、+++は強い染色を示し、空欄は染色されなかったことを示す。なお、type A₁, A₂, V₁, V₂ は、st. IV - VI の時期には特異分布を示すが、それ以前は均一分布である。ウェスタン・ブロッティングの結果は、動物半球側と植物半球側とに切り分けた断片からの SDS 抽出による試料を抗原として用いて得たものである。

Stage	I	II	III	IV	V	VI
Size [μm]	50-300	300-450	450-600	600-1000	1000-1200	1200-1300
Appearance	Transparent	Opaque, white	Light brown	Animal-vegetal difference in pigmentation	Hemispheres clearly delineated	Unpigmented equatorial belt

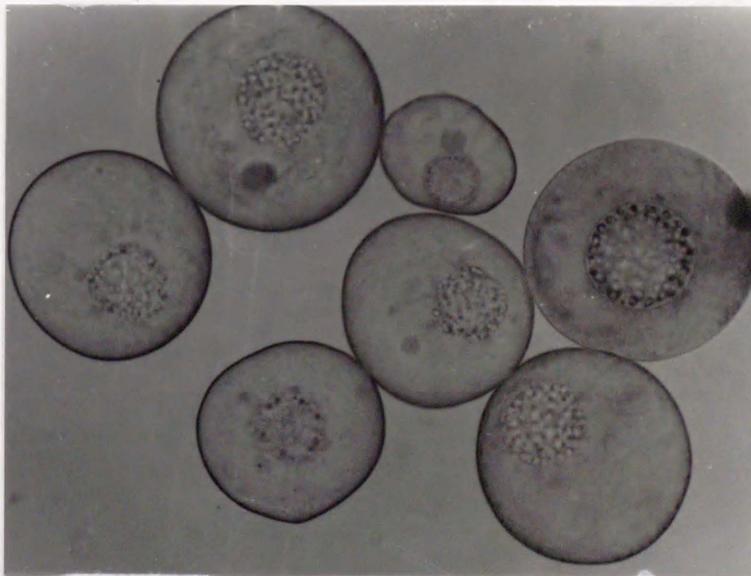


(After Dumont 1972)

図1 卵形成期の各発生段階と形態的な極性。図で示した卵母細胞は、左から順に前卵黄蓄積期、卵黄蓄積期前半、卵黄蓄積期後半（成熟卵母細胞）の形態を示したもので、図の左に外部の形態的特徴、右に内部の形態的特徴を示す。成熟卵母細胞は、さらに産卵されるまでの過程で、卵核胞崩壊が起こり、動物極周辺に白斑を 卵核胞の周辺に透明な細胞質領域(clear cytoplasm)を生じる。



A

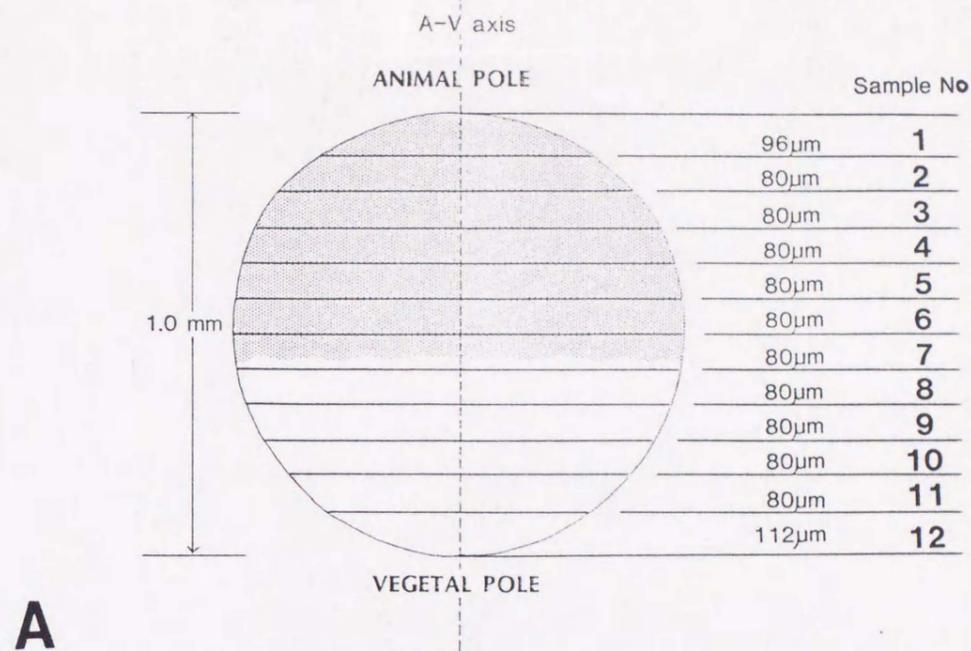


B

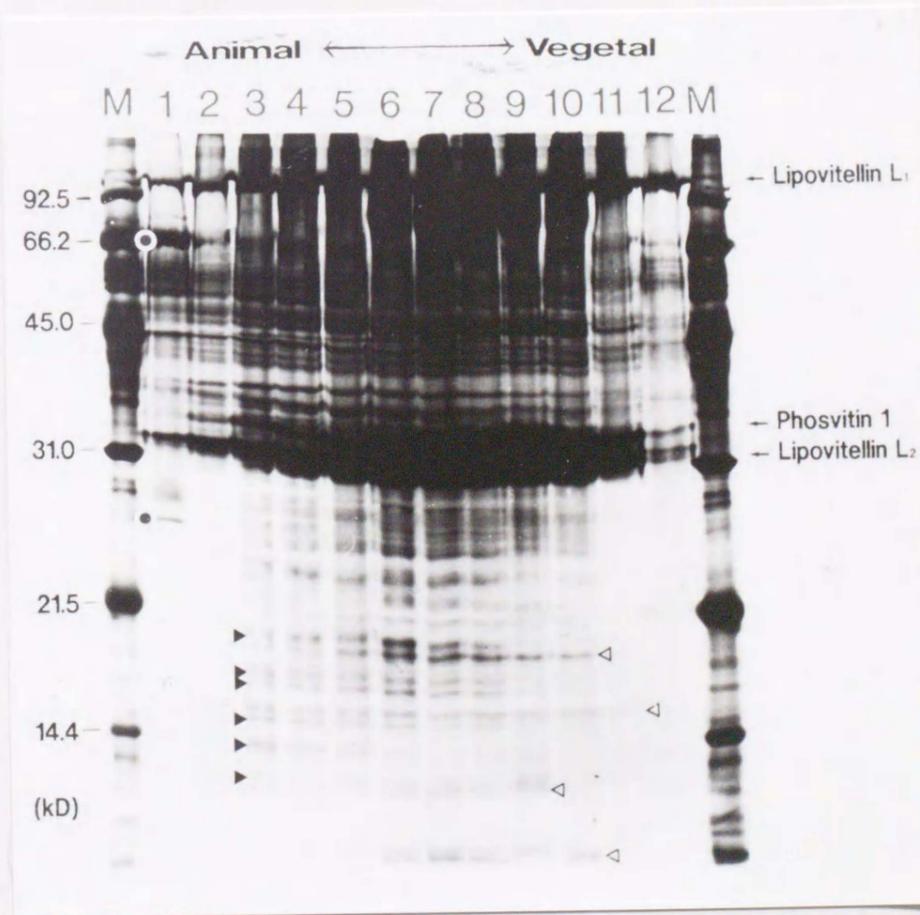
図2. ナイロン網による卵母細胞の分別

A) ナイロン網をセットする容器。ポリスチレン製の遠心管と35mmフィルムの半透明ケースを材料に外筒と内筒をつくり、この間に網を挟み込むようにして任意のサイズのナイロン網をセットする。セットされた円筒は50mlの小ビーカーの中で、卵母細胞の分別に用いられる。

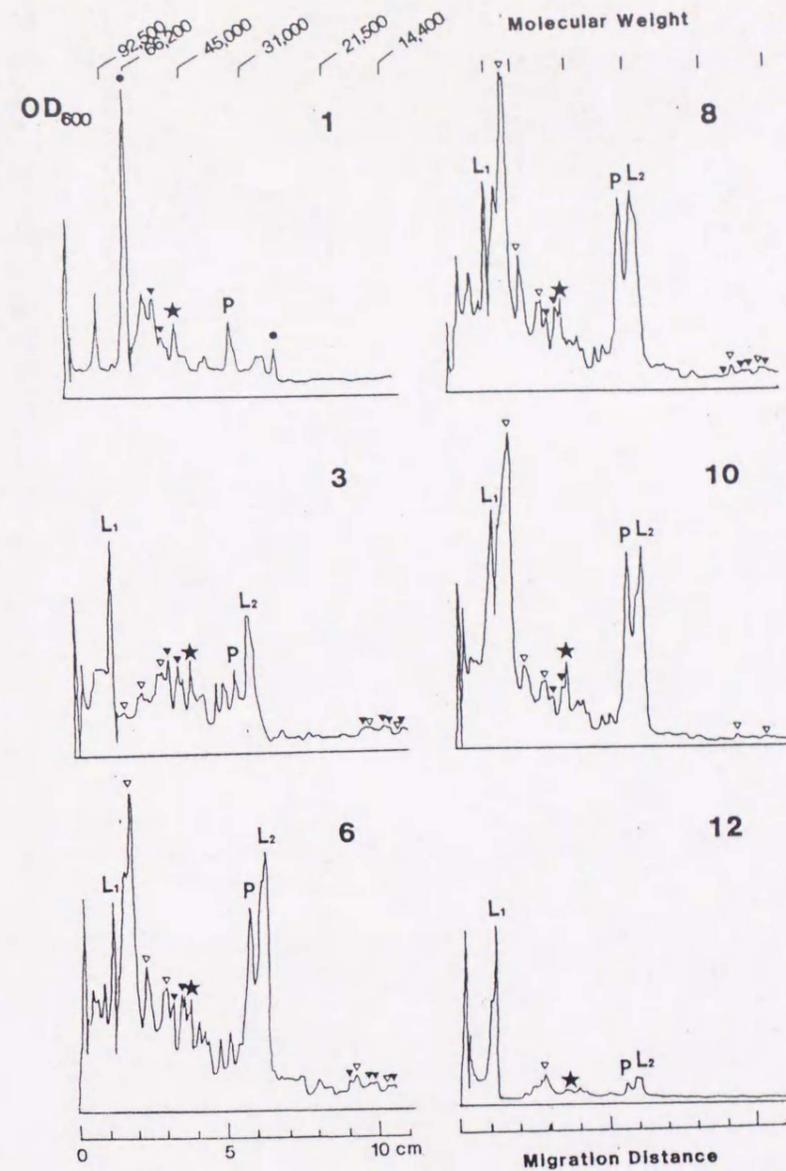
B) 若い成体雌の卵巣からコラゲナーゼ処理とナイロン網による分別により得た卵母細胞。卵黄形成期以前の卵母細胞(st. I)なので、細胞質が透明であり、核内には多くの核小体があり、ミトコンドリア・マスが見られる。バーは300 μ m



A



B



C

図3 試料の薄切片から抽出したタンパク質の電気泳動パターン。
 A) 包埋試料は16 μm ずつ薄切し、これを5枚1組(但し、植物極部位は7枚1組、動物極部位は6枚1組)として、タンパク質試料とした。試料番号は動物極から植物極方向へ順に与えた。
 B) 12の薄切片から抽出したタンパク質のSDS電気泳動パターン。ゲル濃度は15%。銀染色で染色。各レーンの番号は試料番号を示す。両端の2レーンは分子量マーカー。左縦軸に分子量をkDで示す。ゲル上の印は、●:動物極にのみ特異的に存在するタンパク質 ▲:動物半球に偏りがみられるタンパク質 △:植物半球に偏りがみられるタンパク質をそれぞれ示す。
 C) タンパク質の泳動パターンをOD₆₀₀で測定した結果。各グラフの右肩に試料番号、上横軸に分子量、下横軸に泳動距離を示す。図中の印は、★:各試料に共通にみられたもの ●:動物極にのみ特異的に存在するもの ▲:動物半球に偏りがあるもの △:植物半球に偏りがあるものを示す。●印及び分子量21,500以下の▲△の印の位置は、B)と対応。

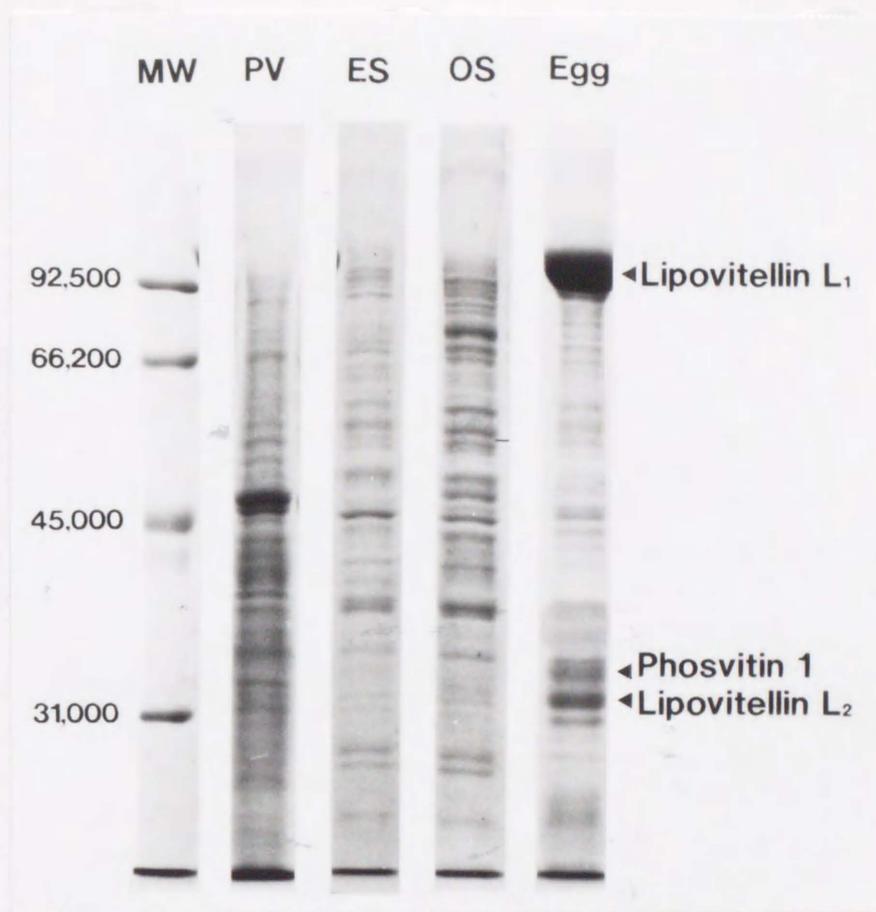


図4．抗原の電気泳動パターン。ゲル濃度は10%でクマシーブリリアントブルー染色を行った。左縦軸に分子量（単位はD）、右縦軸に卵黄顆粒構成タンパク質の泳動位置を示す。試料は左から、分子量マーカー、DumontのステージIの卵母細胞、未受精卵のS100分画、卵巢のS100分画、未処理の未受精卵であり、SDSによりタンパク抽出を行った。

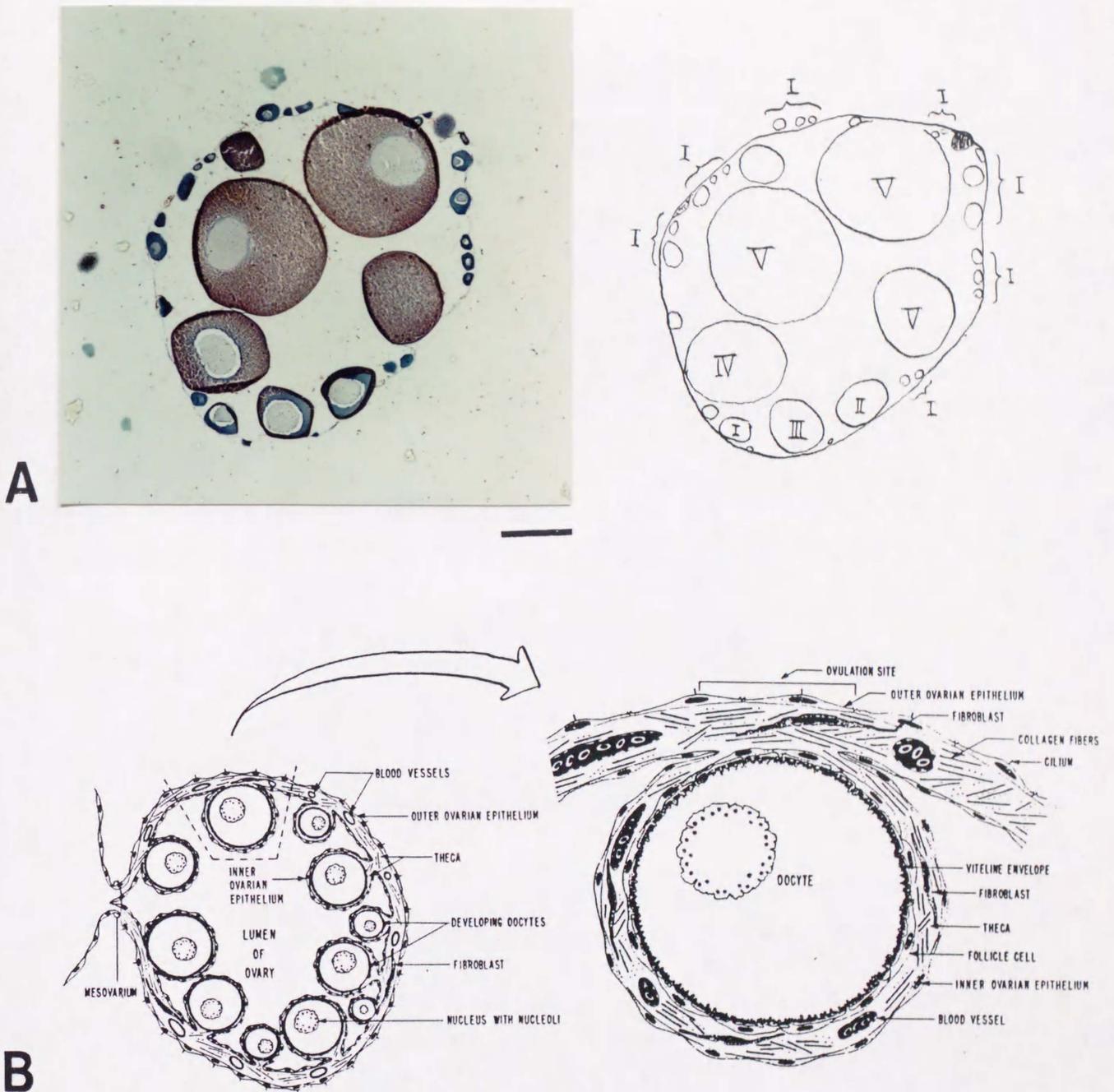


図5. アフリカツメガエルの卵巣の構造。

A) 免疫染色の抗原として用いた若い成体雌から摘出した卵巣のヘマトキシリン-エオシン染色像。卵巣壁（莢壁）にそって様々な段階の卵母細胞が並ぶ。右図に各卵母細胞の発生段階を示す。バーは $500 \mu\text{m}$

B) 卵巣組織の模式図。(Dumont and Brumett 1978)

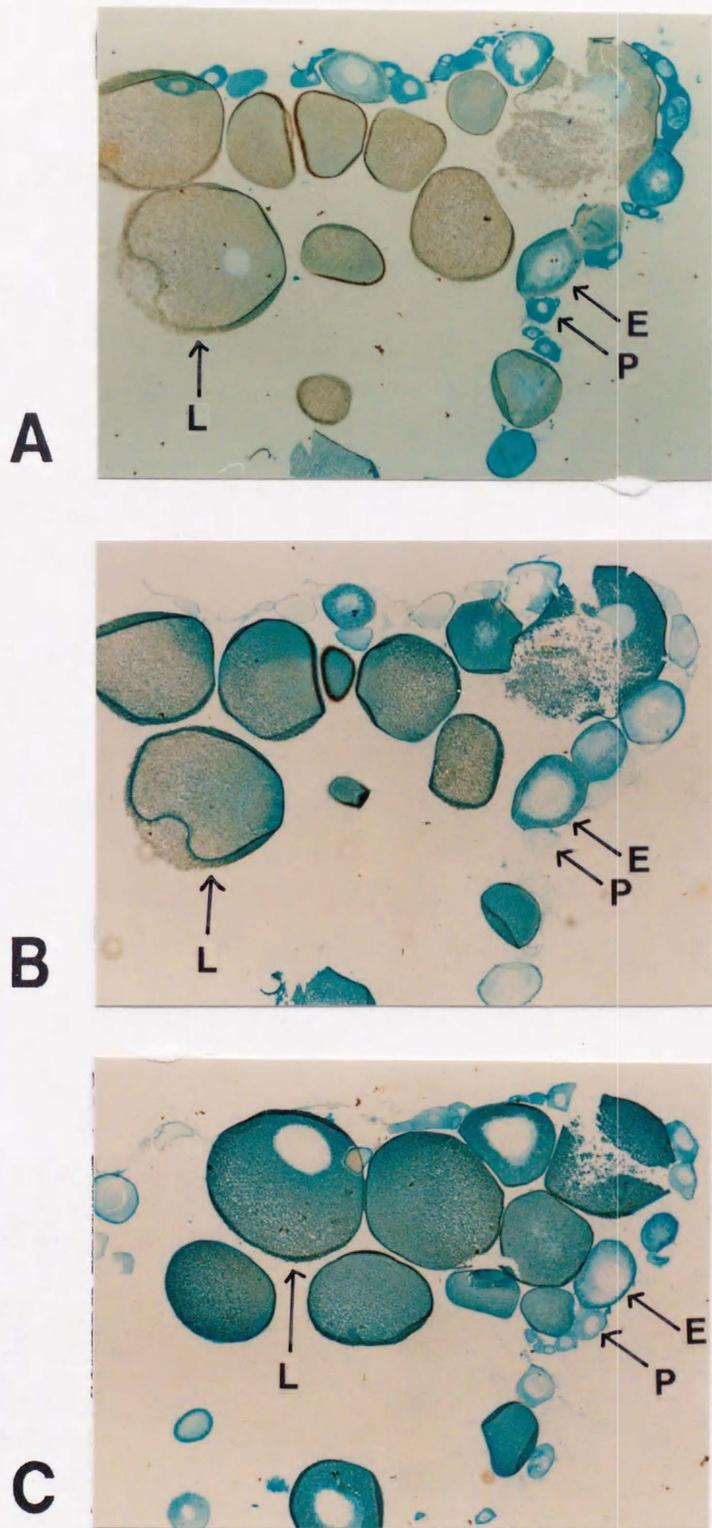
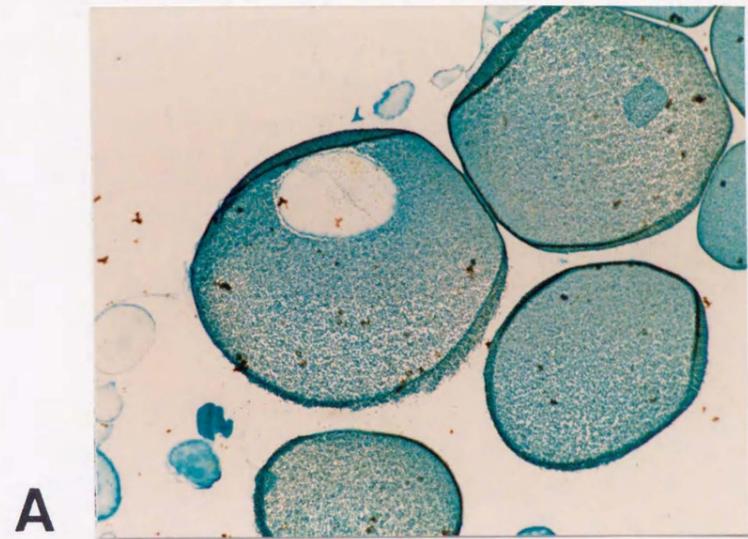
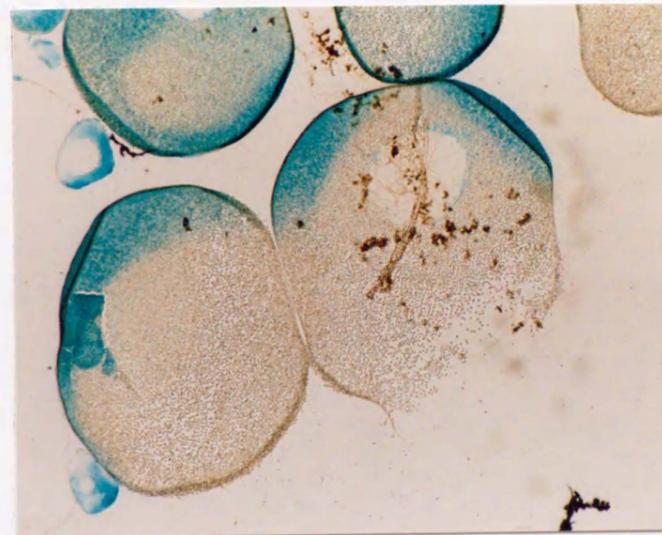


図6. 時期特異性を示す抗体の卵巢切片染色像。各切片は連続切片であり、図中の記号Pは前卵黄蓄積期の卵母細胞、Eは卵黄蓄積期前半の卵母細胞、Lは卵黄蓄積期後半の卵母細胞を示す。バーは500 μ m。

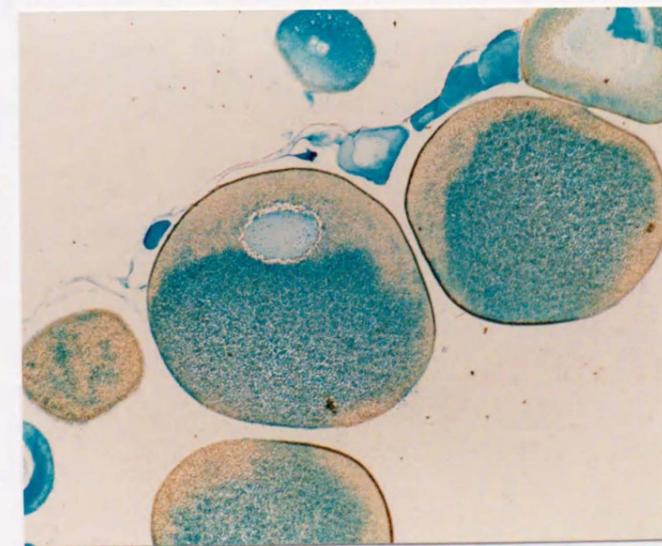
- A) 卵形成期の初期～中期特異的な抗体(PV-34)。
- B) 卵形成期中期～後期特異的な抗体(PV-39)。
- C) 卵形成期の全時期で抗原認識する抗体(PV-20)。



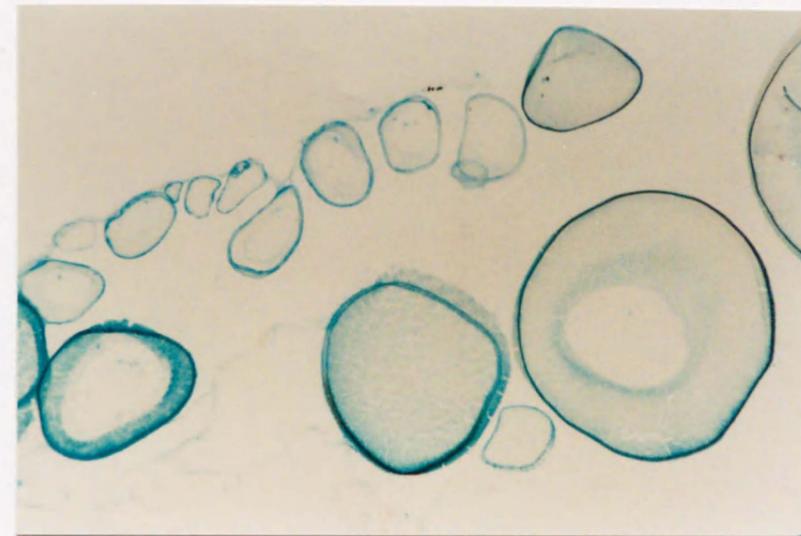
A



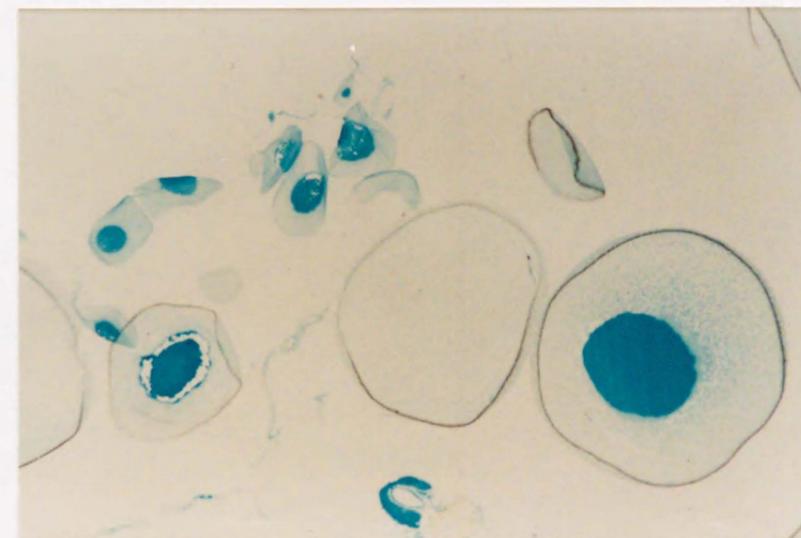
B



C



D



E

図7. 分布特異性を示す抗体の卵巣切片染色像。バーは500 μ m。
 A) 分布特性の無い抗体(PV-20)。 B) type A 抗体(PV-41)。
 C) type V 抗体(PV-12)。 D) type P 抗体(ES-41)。
 E) type N 抗体(ES-107)。

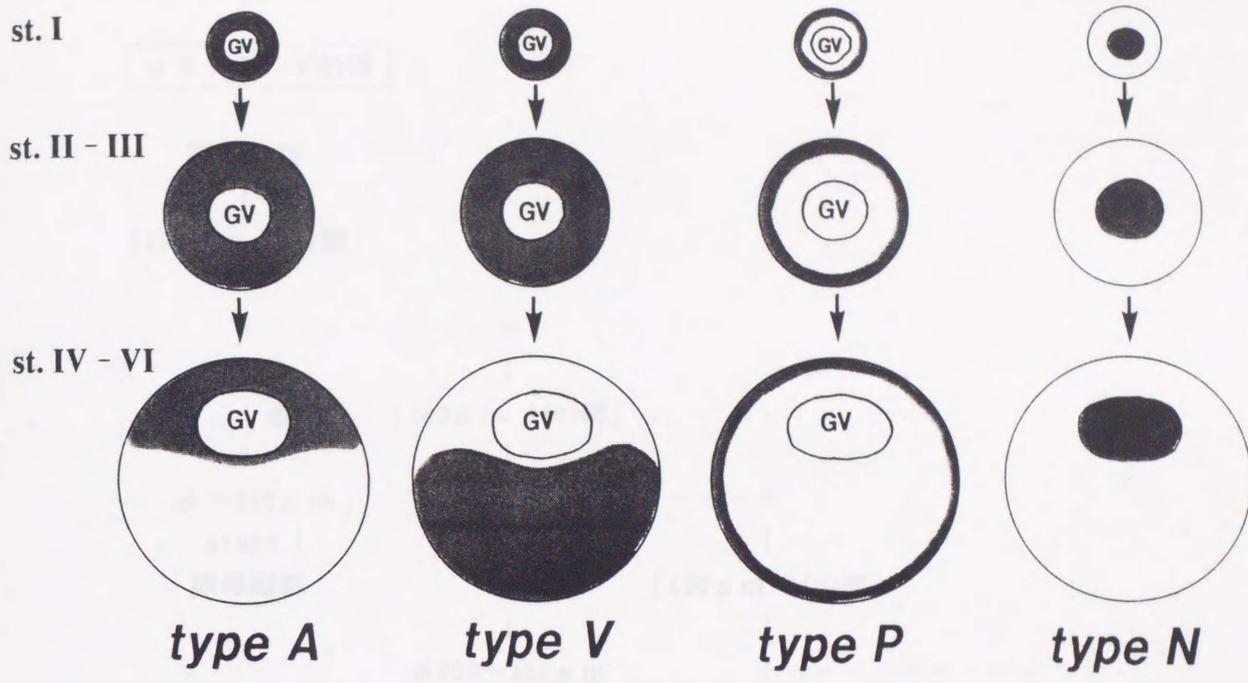


図8．卵母細胞の細胞質に分布特性を示す抗体の認識部位。卵母細胞形成過程を大きく3つに時期を分けて模式図にした。前卵黄形成期(st. I)、卵黄形成期の前半(st. II - III)、卵黄形成期の後半(st. IV - VI)である。

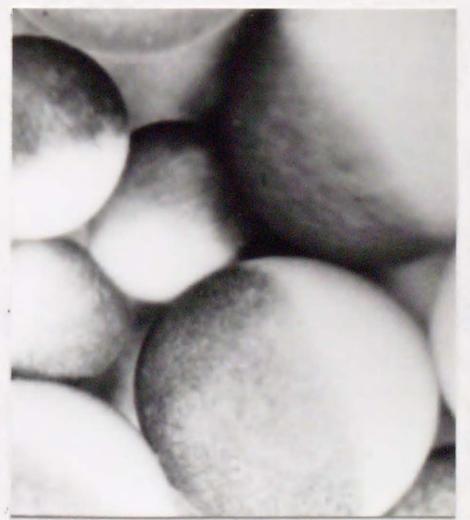
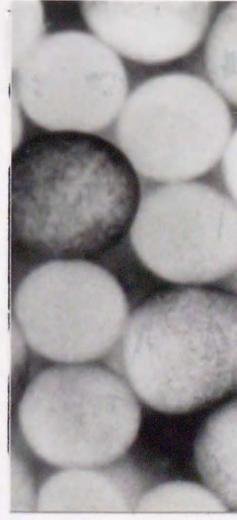
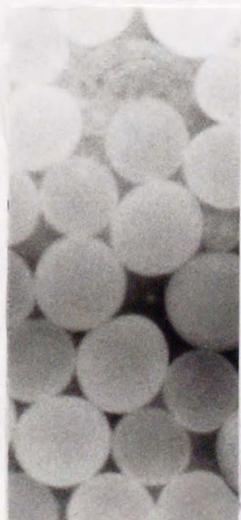
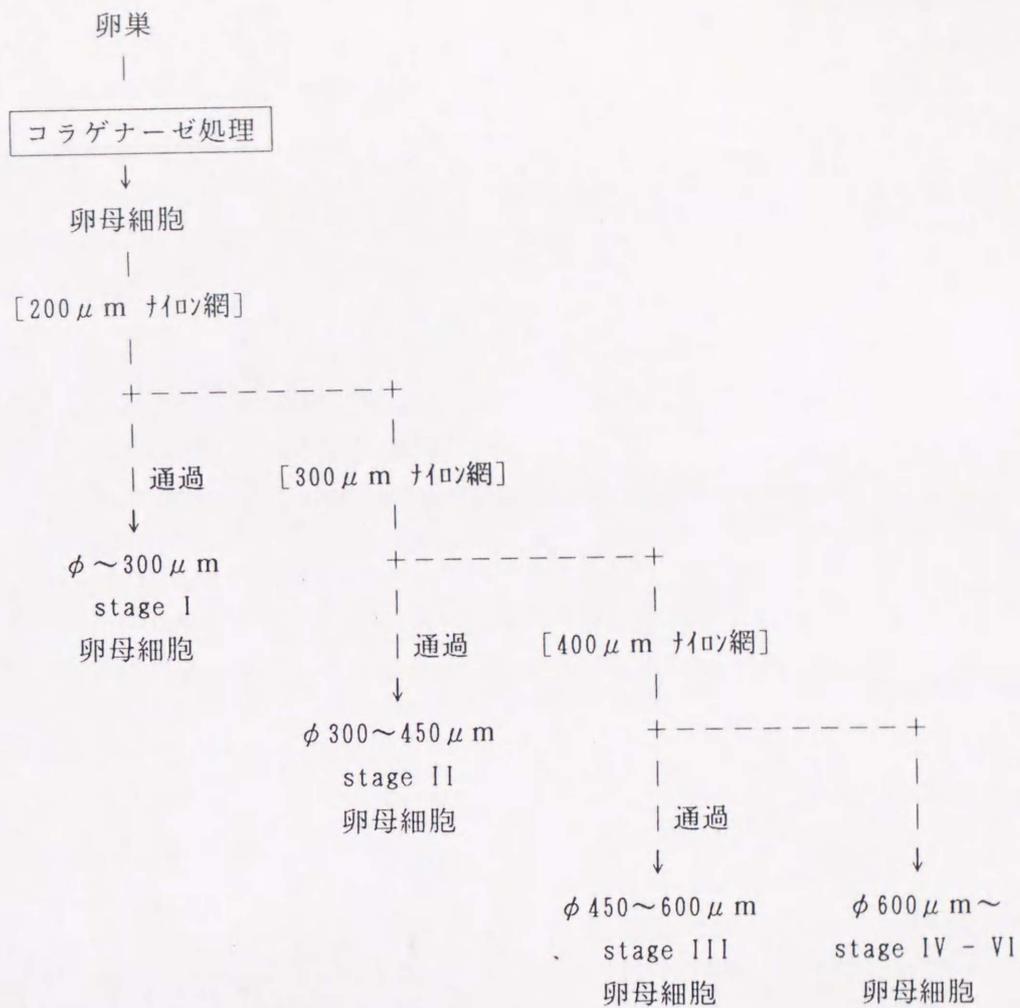


図9. 卵母細胞をサイズ別選別する過程。写真は左から、直径300 μ m以下(st. I)、直径300 - 450 μ m(st. II)、直径450 - 600 μ m(st. III)、直径600 μ m以上(st. IV - VI)の卵母細胞。

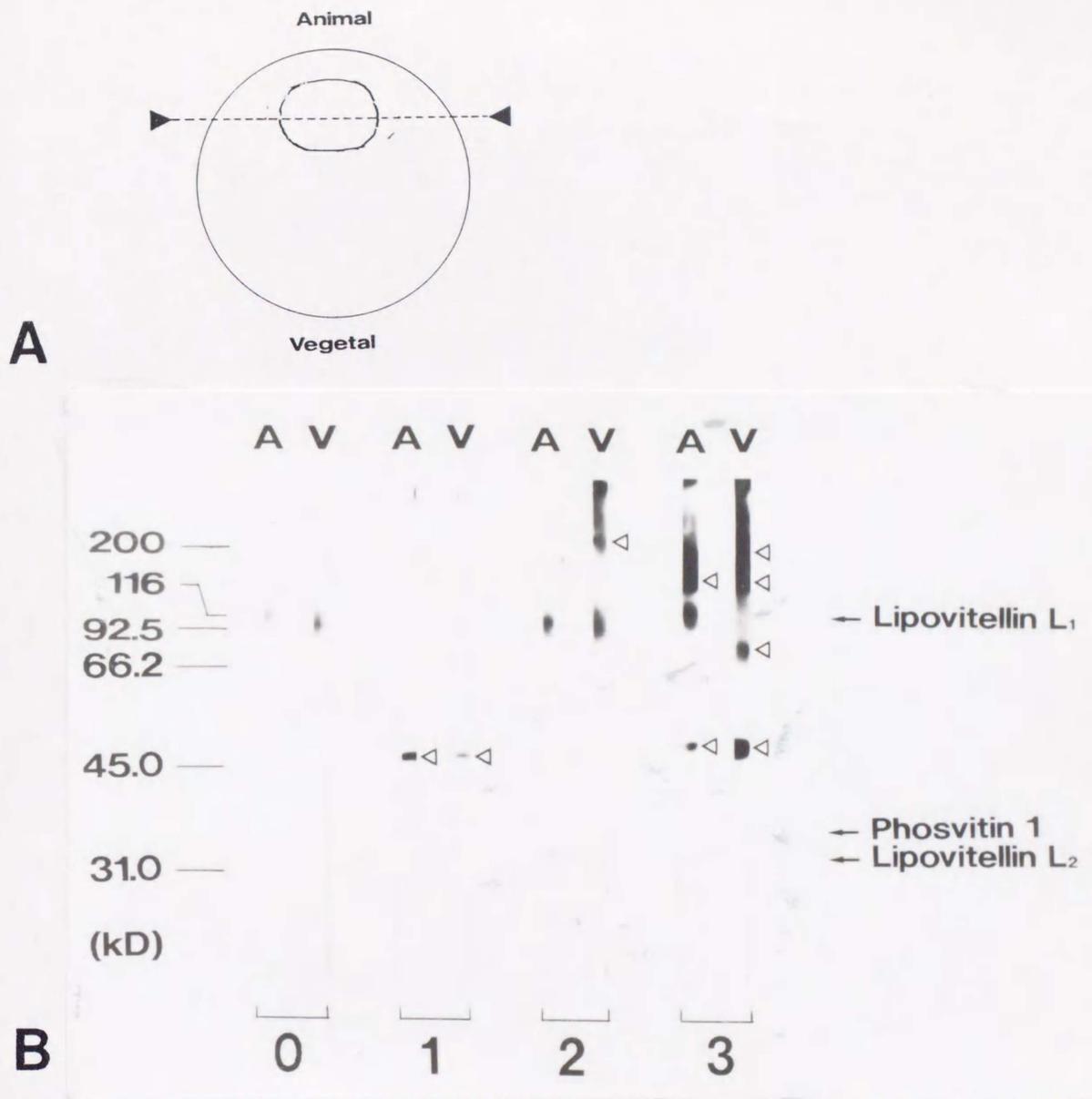


図10. 抗原の極性分布を調べるためのウェスタン・ブロッティング。

A) 成熟卵母細胞の2分割する部位。破線部が切断面で、それよりも上を動物半球側断片、下を植物半球側断片として扱った。

B) ウェスタンブロッティングの結果。図の左に分子量をkDで、右に卵黄タンパク質の泳動位置を示す。各レーンは2本1組で、上端に抗原として泳動したタンパク試料が動物半球側断片からの抽出液であるか(A)、植物半球側断片からの抽出液であるか(V)を示す。レーン0はコントロールの抗体として、マウス抗アフリカツメガエル血清アルブミンモノクローナル抗体を用いた。レーン1は、type A₁抗体(ES-78)の結果。レーン2は、type V₂抗体(PV-88)の結果。レーン3は、type P抗体(ES-61)の結果。図中△印は、それぞれの抗体が認識している抗原のバンド位置を指す。レーン0、2、3に分子量120kD付近のバンドが見られるが、リポビテリンL₁と抗体の非特異的吸着と思われる。

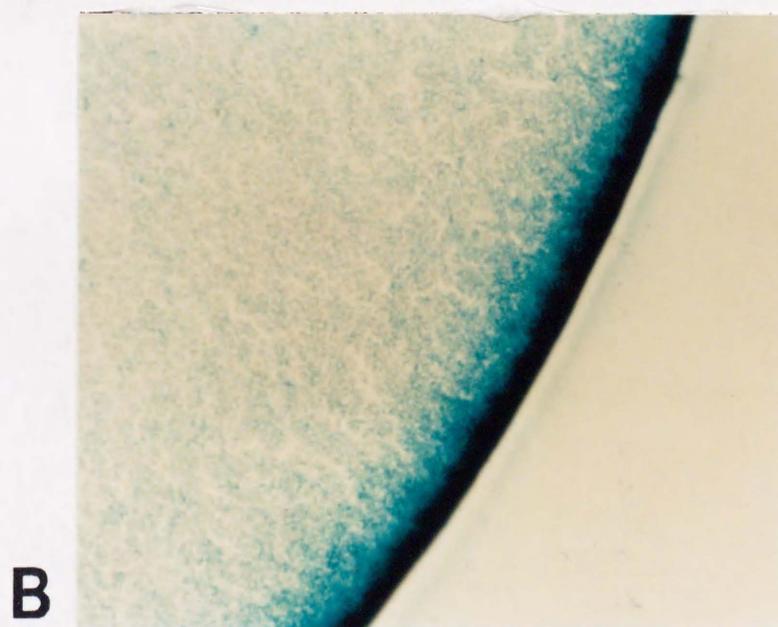
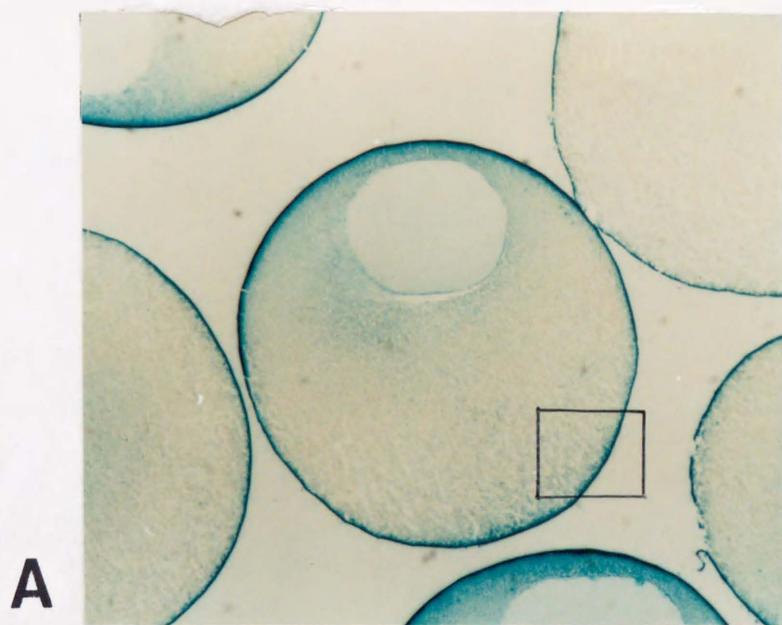


図11. ES-41 抗体 (type P) の認識部位。
A) 脱ろ胞化した卵母細胞 (st. VI) の染色像。
B) 写真Aの囲み部分の拡大。

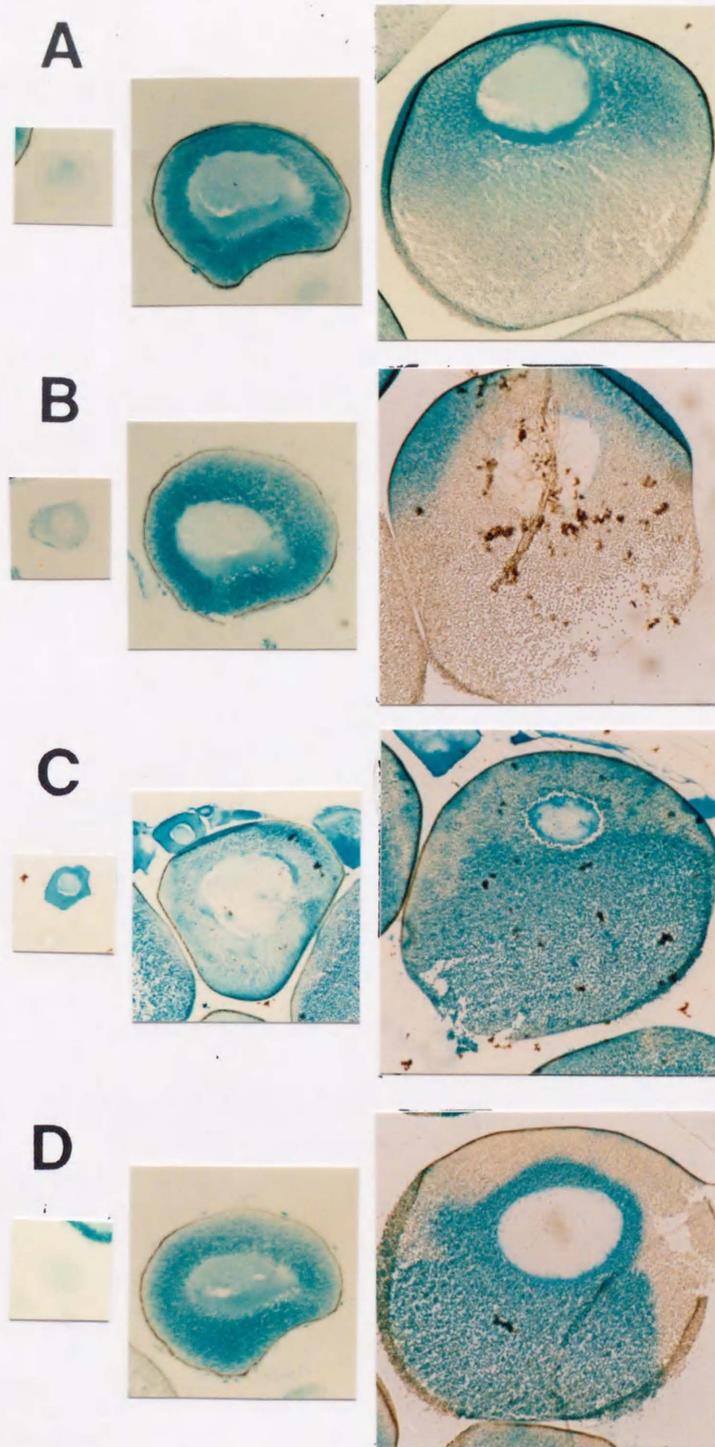


図12. 卵母細胞の細胞質に部域性を持って分布する抗原。写真は左から、st. I (前卵黄形成期)の卵細胞、st. III (卵黄形成期の前半)の卵母細胞、st. V - VI (卵黄形成期の後半)の卵母細胞。いずれの写真も、卵母細胞の動植物軸が図面の上下方向にできるだけ一致するように並べた。バーは、500 μ m。

A) type A₁ 抗体(PV-83)。 B) type A₂ 抗体(PV-41)。

C) type V₁ 抗体(PV-13)。 D) type V₂ 抗体(PV-88)。

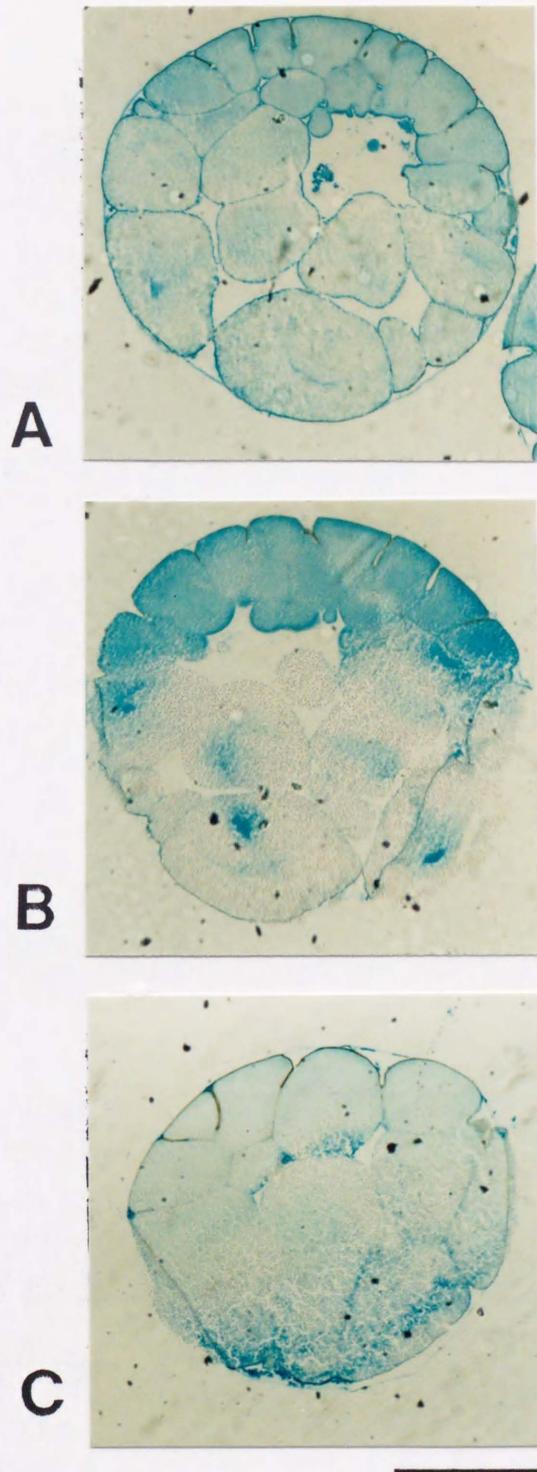
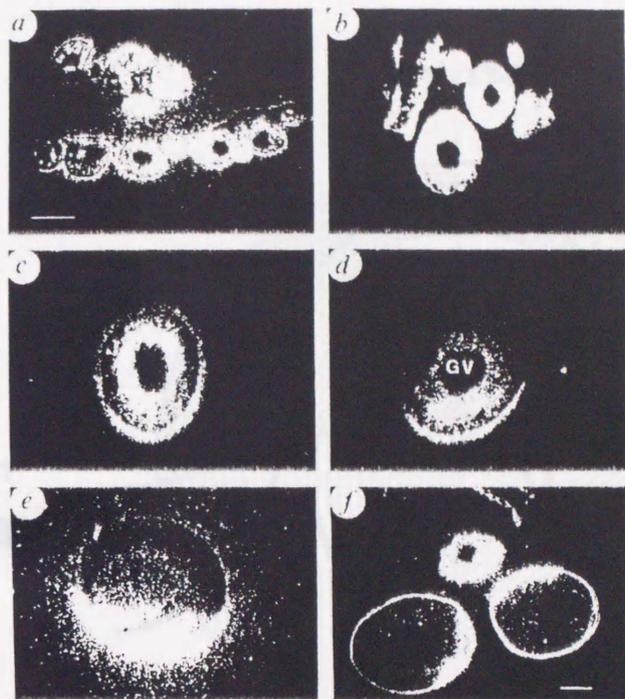
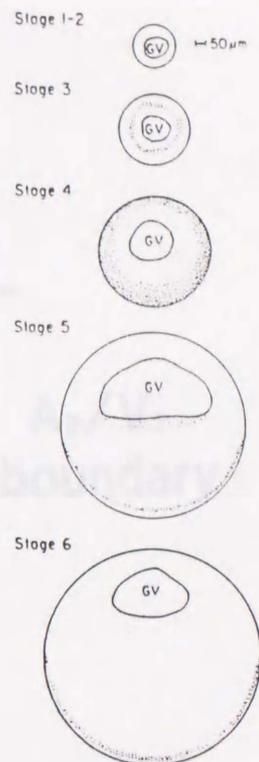


図13. 胞胚期における抗原分布。バーは500 μ m。

A) PV-21 抗原(type A₁)。 B) PV-41 抗原(type A₂)。 C) PV-13 抗原(type V₁)。



A Fig. 3 Translocation of Vg1 RNA during oogenesis. *In situ* hybridizations were performed with an antisense Vg1 RNA probe as described in Fig. 1 legend. Albino oocytes at various stages of growth are shown. The black hole present in the centre of most sections is the nucleus or germinal vesicle (GV). The stages according to Dumont²¹ are I, II, III, III and IV for a-e, respectively. The scale bar in a is 200 μm and applies to a-e. A stage-II and two stage-IV oocytes from a wild-type female are shown in f, where the scale bar is 200 μm. Note that the white ring around the pigmented oocytes is due to the pigment granules in the cortex.



B

図14. mRNAの局在性。

- A) 植物半球から作製されたcDNAライブラリから選別されたVg-1RNAの分布。(Melton 1987)
- B) [³H]poly(U)を用いた *in situ* hybridization によって明らかにされた poly(A)⁺ RNAの極性分布。卵母細胞の各段階に応じて存在する領域が変化する。(Capco & Jeffery 1982)

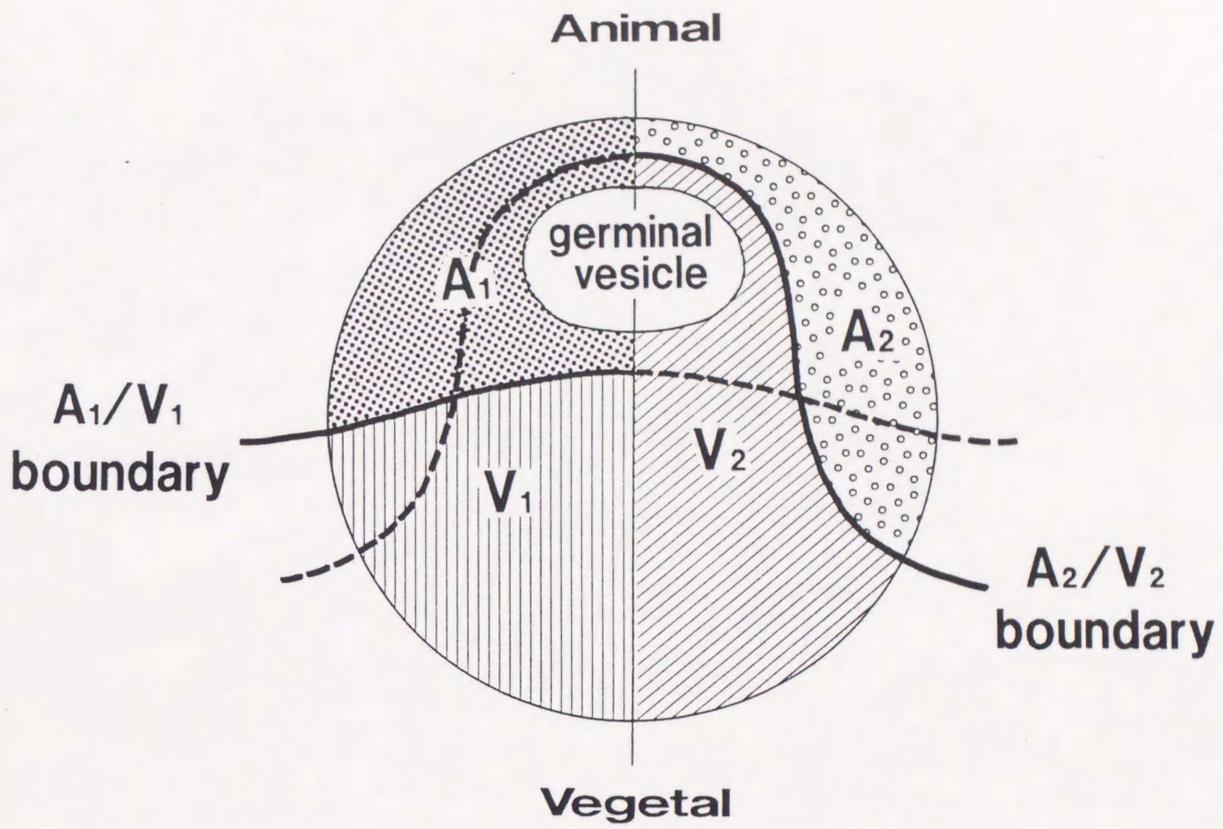


図15. 成熟卵母細胞の動植物軸性に沿った抗原の分布域を示す模式図。type A₁ 抗原と type V₁ 抗原の分布域を図の左側に、type A₂ 抗原と type V₂ 抗原は図の右側に示した。