

平成 19 年度 卒業論文

Convergent Extension 関連因子のリストアップ

～伸長を起こすアニマルキャップ細胞群は生殖細胞系列遺伝子を強く発現する～

静岡大学教育学部理科教育講座

黒田研究室所属

3041-4317

原 佑介

目次

目次	• • • • • p. 1
要旨	• • • • • p. 2
導入	• • • • • p. 3
方法	• • • • • p. 6
結果	• • • • • p. 10
考察	• • • • • p. 27
謝辞	• • • • • p. 38
参考文献	• • • • • p. 39
追加資料	• • • • • p. 45

要旨

原腸形成時に、胚の中では Convergent Extension (収斂と伸長) と呼ばれる細胞相互の入り込み運動が起こる。これによって胚は球状の受精卵から前後軸方向へ細長く伸びた形へと劇的な変化を遂げることができる。この発生機構を解明することは、生物の形態形成を考える上で非常に重要である。しかし、この現象をどの遺伝子が引き起こしているのか、各シグナル伝達経路がどのように関わっているのかといった点に関しては、未だはっきりしていない事が多い。

そこで本研究では、Convergent Extension を引き起こす因子を見つけるために、マイクロアレイ技術を用いた解析方法を考案した。まず、アフリカツメガエル胚のアニマルキャップ解離・再集合細胞とアクチビンを用いて、胚が伸長する細胞群と伸長しない細胞群の2種類を作り分ける実験系を確立した。これにより、サンプル間の差異が Convergent Extension 現象のみに絞られ、遺伝子を比較する上で非常に都合の良いシンプルな系が得られた。続いて、2種類のサンプルからそれぞれ RNA プローブを作成し、マイクロアレイによる遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、調査した 43803 配列のうち 77 配列が各系の間で2倍以上の差別的発現を示した。驚くべきことに、10 倍以上の変化を示した上位 5 つの配列が全て生殖系列遺伝子であることが判明した。

以上の結果より、Convergent Extension に特に関連していると考えられる遺伝子をリストアップすることができた。ここでは、それらの遺伝子について整理したデータを示し、きわめて強い発現をした生殖系列遺伝子についての見解を述べる。また、Convergent Extension を解析していく上で特に注目すべき遺伝子を挙げる。

Keywords : Convergent Extension, germ line, Frizzled-8, ツメガエル, マイクロアレイ

導入

動物の発生は受精卵というひとつの球状の細胞から始まる。その受精卵が細胞分裂を繰り返して細胞を増やし、そこに種々の要因が加わることによって、多様な形作りが間違われることなく行われていく。この一連のプロセスは生命が生命として存在するために必要な要素の1つであり、この仕組みを解明すべく、長年多くの研究者が研究を続けてきた。

そうした動物の発生の中でも原腸形成は動物のボディプランの中核を成す生命現象として注目されている。この細胞運動によって、細胞は相互に関わり合いながら移動し、外胚葉・中胚葉・内胚葉の組織を正しい位置に導いていく。同時に、背腹軸・左右軸・前後軸といった体の方向性をより明らかにしていき、生物の複雑な形作りを開始していく。軸形成の中でも特に目を引くのが前後軸の形成であり、原腸陥入運動に続いて胚では前後軸方向へ沿って大きく伸長するという胚発生にとっての一大イベントが始まる。この現象は、Convergent Extension（収斂と伸長：以降CEと略）と呼ばれる細胞運動によって引き起こされることが分かっている(Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988)。背側の中軸中胚葉領域にある細胞が胚の左右軸方向から前後軸（中心軸）に向かって収斂し、細胞同士が相互に間に滑り込んでいくことが、胚が前後方向に伸長する力となる(Keller, 2002)。これによって胚は、球状の受精卵から細長く伸びた形態へと劇的な変化を遂げるのである。

この様な細胞運動についての詳細な解析は、動物の基本的なボディプランを理解するために必要な作業である。近年の精力的な研究により、原腸形成時の細胞運動について様々なことが記述され続けており、原腸形成運動に関する細胞運動の詳細が次第に明らかになってきている。また、CEにおける細胞の相互入り込み運動についてはPCPシグナル伝達経路と呼ばれるnon-canonical Wntシグナルを通じたシグナル伝達により、細胞が極性化されることが主要な役割を果たしているということが報告されている(Tada et al., 2002; Goto et al., 2005; Jenny

and Mlodzik, 2006)。しかしながら、Wnt シグナル伝達経路は非常に多くの因子に関わる非常に複雑な経路であり、その全体像はまだ明らかにされていない。さらに、CE に関係する細胞の極性化には Wnt/PCP シグナル経路が確かに関わっているが、前後軸の形成自体には Wnt/PCP シグナルを損ねても影響はないという報告も成されており (Ninomiya et al., 2004)、前後軸形成のための因子というのは全くと言っていいほど不明である。

本研究は、この分野の研究、特に CE について新しい知見を加えるべく考案された。前述したように中軸中胚葉領域では細胞間の相互入り込み運動が見られるが、それにはそこに存在する細胞の内在的な前後極性の形成が必要不可欠であることが報告されている (Ninomiya et al., 2004)。この報告から、Wnt/PCP シグナルから独立して CE を起動する内在因子の存在が示唆された。したがって我々は、この CE を起動する能力を持った内在因子のリストアップを試みた。

CE について研究するには、アクチビン処理されたアフリカツメガエルのアニマルキャップやその解離細胞が用いられることが多い。なぜならば、アクチビン処理されたアニマルキャップは伸長運動を行うことが確認されており、これが原腸陥入時の中軸中胚葉の伸長を模倣していると考えられているためである。アクチビンは TGF- β ファミリーに属する成長因子であり、アクチビンの濃度によって予定外胚葉から腹側中胚葉、背側中胚葉、内胚葉性組織が誘導できることが知られている (Green et al., 1994; Kuroda et al., 1999)。また、前方-後方の位置価もアクチビンの濃度依存的に決定されることも分かっている (Green et al., 1997)。近年では、胚の伸長には前方中胚葉と後方中胚葉それぞれに誘導された組織が必要であり、両方が密接に関わり合うことによって初めて CE が引き起こされるという報告もされている (Ninomiya et al., 2004)。これらの事実から、CE 関連因子を探るにはアクチビン処理したアニマルキャップ解離・再集合組織をマイクロアレイで解析する手法が有効であると考えた。

DNA マイクロアレイとは、細かく区切ったガラス基盤の表面に DNA 断片の配列を高密度に配置

し固定したものである。比較したい遺伝子サンプルを2つ以上用意し、異なる色素でそれぞれを染色した後に基盤上へとハイブリダイズさせる。そしてその蛍光度を検出することによって、各遺伝子の発現度を数値化する。これを用いることにより数万種類の遺伝子の発現解析を一度に行うことができる。異なる形質を示すサンプルを用意できる場合、その遺伝子発現の変化を比較するのは最も有効な解析手段となりうる。従って、本研究ではこの解析手法を採用した。

我々はまず、CEを起こす細胞群と起こさない細胞群を作り分ける実験系を構築した。アフリカツメガエルのステージ9胚よりアニマルキャップを切り出して解離させた後、アクチビン溶液を用いて濃度差別的に処理した。その後、再集合させて前方組織と後方組織を作り出した。その組織をそれぞれ単独で培養したものと前方後方組織を混ぜて培養したものとを比較して、この実験系が正しく働くかどうかを確認した。

続いて、前述した実験系を用いて、伸長する組織群と伸長しない組織群から2つのサンプルを作成した。これよりTotal RNAを抽出し、2色法によるマイクロアレイ解析を行った。

最後に、マイクロアレイ解析によって得られた結果を整理した。マイクロアレイは得られた解析結果をそのまま用いることはできない。全解析遺伝子の中より一定値以上の顕著な発現を示したものを選び出して分析することによって、初めて有効なデータとして利用することができるようになるのである。本研究では非伸長条件に比べて2倍以上の発現差のあったものを有効なデータとして選び出し、遺伝子に対する詳細なデータを収集した。強い発現を示す遺伝子はCEに係る因子の可能性が高いということから、Wntシグナル関連の遺伝子や頭部・神経系の遺伝子などであろうと予想された。しかし、実際に得られた結果は生殖系遺伝子が上位を占めることになった。

方法

胚の取り扱い

アフリカツメガエル胚は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ゲストロン[®]3000 /川崎三鷹製薬株式会社）を 600 unit 注射したメスより得られた。オスの精巣の半分を細かく切り刻み作成した精子懸濁液を用いて人工受精を行った。精子懸濁液や胚操作後の培養には 1×スタインバーグ氏溶液（58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM CaNO₃-4H₂O, 0.83 mM MgSO₄-7H₂O, 0.1 g/L Kanamycin, 5 mM Tris, -HCl, pH 7.35-7.45）を用いた。胚操作までの培養には 0.1×スタインバーグ氏溶液を用いた。ゼリーコートは 0.1×スタインバーグ氏溶液で作成した 3%システイン溶液を用いて溶解させた。受精膜はピンセットを用いて実体顕微鏡下で取り除いた。胚発生のステージは、ニューコープらが報告したもの (Nieuwkoop and Faber, 1967) に従った。

アクチビン処理

10 μg のアクチビン粉末（東京大学の浅島誠研究室より送ってもらったもの）を、ウシ血清アルブミン（Albumin, from Bovine Serum, Cohn Fraction V pH 7.0 /和光純薬工業株式会社）を 0.1%濃度で含む 1×Ca²⁺-Mg²⁺-free スタインバーグ氏溶液（58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.1 g/L Kanamycin, 5 mM Tris, -HCl, pH 7.35-7.45）1 ml に溶解させ、それを分抽して 100 ng/10 μl のアクチビンストックを作成した。尚、この BSA を含む 1×Ca²⁺-Mg²⁺-free スタインバーグ氏溶液を以降 CMFSS（Ca²⁺-Mg²⁺-free Steinberg's Solution）と呼ぶ。

本実験では 1 ng/ml および 4 ng/ml の濃度のアクチビン溶液を作成した。CMFSS 15 ml に、前述したアクチビンストック 6 μl を加えて 4 ng/ml アクチビン溶液とした。さらに CMFSS 9 ml に、4 ng/ml のアクチビン溶液 3 ml を加えて 1 ng/ml アクチビン溶液とした。

アクチビン処理は解離細胞をその溶液中に 1 時間浸すことによって行った。処理終了時には、

アクチビン含有液をできるだけ取り除いた後に1×スタインバーグ氏溶液を加えて数回洗い処理を施した。なおこの一連の処理は全て、6%の Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Poly-HEMA /SIGMA) をエタノールに溶かしたものでコートして乾燥させた 30 mm プラスチックプレート (アズノールシャーレ φ30×15 /アズワン株式会社) の中で行った。以降、この Poly-HEMA で処理をしたプレートのことを Poly-HEMA プレートと呼ぶ。

解離

アニマルキャップ細胞を解離させる方法は、黒田ら (Kuroda et al., 2005) の論文に従った。Poly-HEMA プレート A を CMFSS で満たし、その中でステージ 9 胚よりタングステン針を用いてアニマルキャップを切り出した。切り出したアニマルキャップを同じ溶液で満たした Poly-HEMA プレート B に移して 10 分間放置した。丁寧にピペッティングして細胞同士を解離させ、表層細胞は取り除いた。プレート B を手で細かく 50~100 回程度旋回させ、細胞をプレートの中央へと集めた。

再集合

解離細胞を 1×スタインバーグ氏溶液の入った 1.5 ml シリコナイズドチューブへと移す。室温の下 100 g で 30 秒間遠心し、チューブの底へと細胞を集合させた。細胞同士が再び接着し合っ
て一つの組織片となるまで、室温で 45 分間静置した。

外殖体操作

再集合から 45 分間静置後に、チューブを指で軽くタッピングして底面に再集合している細胞片を剥がしとった。単独で培養する細胞片については、同チューブ内でそのまま静置を続けた。

結合させる細胞片については、太口のガラスピペットを使って片方の細胞片をもう片方のチューブへと移し、室温の下 100 g で 30 秒間遠心することによって細胞片同士を結合させた。その後は細胞片が丸くなるまで室温で 120 分間静置した。

再集合させた細胞片の伸長を助けるためには、表面を予定外胚葉層で囲んだ方が効果的である (Ninomiya et al., 2004)。そのために、14 °C 保存しておいた同腹の胚 (ステージ 10.5-11 頃) より予定外胚葉表層細胞を採取した。採取方法は前述した解離操作と同様である。細胞片の 120 分間静置が終了した後、1×スタインバーグ氏溶液で満たした Poly-HEMA プレートを用意し、条件ごとに細胞片と採取した表層細胞をプレートに移した。ピンセットを用いて、細胞片を表層細胞で包み込み、細胞片との接着を確認した後に 22 °C で一晩静置培養した。

RNA 抽出

RNA 抽出に用いた細胞片は、観察に用いたものとは別に用意した。マイクロアレイ解析に必要な mRNA の量は各サンプルごと 1 µg であったため、今回はアクチビン処理ごとに 20 個のアニマルキャップを用意した (mRNA 抽出量の目安: 全胚 1 個分 ≒ 解離細胞 10 個分 ≒ 再集合細胞 20 個分 ≒ 2µg)。

抽出作業は、細胞片同士を結合させてから 90 分間放置した後に行った。サンプルは 1) 単独培養した非伸長条件の細胞片 2 つと 2) 結合させて培養した伸長条件の細胞片の 2 種類を用意した。

ホモジナイズはチューブごとに 1 ml の RNAiso (RNAiso / タカラバイオ株式会社) を加えて行い、その後の作業は RNAiso のプロトコールに従った。プロトコールはタカラバイオ株式会社の製品ページ (http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFfiles/9105_9107_j.pdf) より参照できる。

マイクロアレイ

マイクロアレイは、Agilent In-situ オリゴDNAマイクロアレイ2色法 4×44 Kフォーマットのプロトコールに沿って行った。プロトコールは後述のAgilent社Webページのサイトからダウンロードできる (<http://www.chem.agilent.com/temp/radB6B23/00001389.PDF>)。

用いたアレイは、上記プロトコールにある4×44 Kフォーマットのものを用いた。ただし市販されているものではなく、東京大学浅島研究室で独自にカスタマイズされたものを用いた（製品番号なし）。このアレイには一枚のスライドグラスに43803種類の配列が4セット、スポットされている。内訳は、2005年12月5日の Unigeneを元にした28256種類の遺伝子に特異的な配列がそれぞれスポットしてある。余った15547スポットには、“ESTとして出現頻度の高いもの” “浅島研究室において特に注目したい遺伝子” を重複させて別の配列としてスポットしてある。

結果のスキャンにはアジレントG256AAスキャナを用いた。スポットの数値化にはアジレントスキャナに付属するFeature Extractionソフトウェアを用い、バックグラウンドの引き算、色素補正を行い、最終的な2サンプルの発現比(LogRatio)と統計処理されたエラー値とP値を出力した。数値データの整理・解析には、Microsoft社のExcelを用いた。

なお、今回のアレイ実験にはカラースワップ法を取り入れた。アレイ1ではTube1&4にCy3ラベル、TubeMixにCy5ラベルをそれぞれ入れて両者を比較した。一方、アレイ2ではTube1&4にCy5ラベル、TubeMixにCy3ラベルをそれぞれ入れて両者を比較した。この方法をとることにより、独立して2回のアレイができ、色素ごとの各配列に対する取り込まれやすさの差を軽減することが出来た。

結果

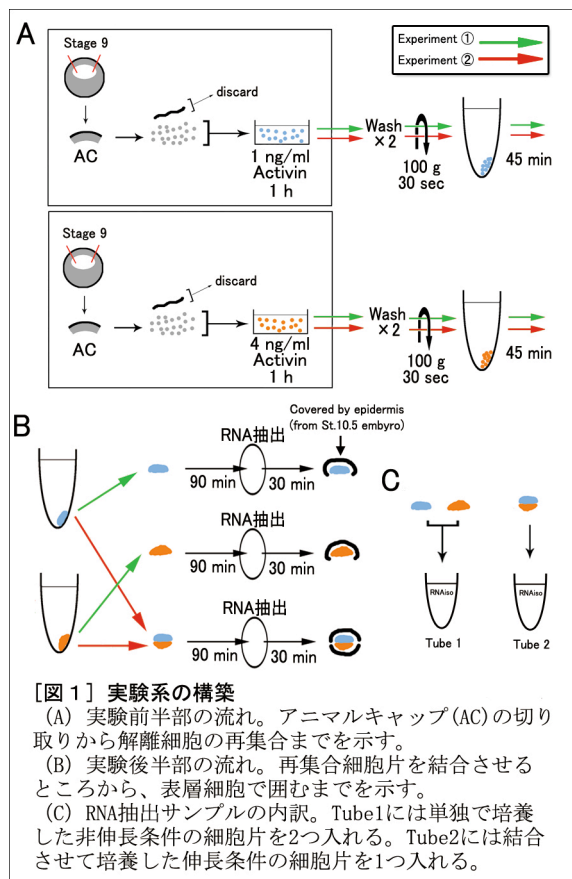
スクリーニング元の作製

本研究の目的は、Convergent Extension（以降CEと略）に関連する因子を見つけることである。解析方法としてマイクロアレイを用いたが、そのためにはCEを起こすサンプルと起こさないサンプルの2種類を用意し、遺伝子間の差異をCE関連のものに限定する必要がある。我々は二宮ら(Ninomiya et al., 2004)の報告に基づいて、それを実現できる実験系を設計した（各実験の詳細な操作については、前述の“材料と方法”の項を参照）。

図1Aに示すように、ステージ9を確実に過ぎた胞胚からアニマルキャップを切り出した。余った胚はコントロール用と表層細胞採取用とに分け、14℃で保存した。CMFSS中に浸してキャップを解離させ、異なる濃度のアクチビンで処理した。このときのアクチビン濃度（1 ng/ml & 4 ng/ml）は、黒田らの論文(Kuroda et al., 1999)

を参考にして、脊索を作りかつ前後中胚葉を確実に作り分けられる濃度を選択した。中胚葉誘導を受けた細胞から前後の組織を作るために、アクチビン処理後に遠心して再集合させた。

図1Bに示すように、再集合後は45分間の時間において、細胞が丸く集まって来るのを待った。続いて単独で培養するものと結合させて培養するものと3つの細胞片を作り、再び細胞が丸く集まって来るまで2時間待った。この待機時間のうちに、14℃保存しておいた胚より表



層細胞を切り出した。そして Poly-HEMA プレート上にて細胞片を表層細胞で囲み、一晚培養した。

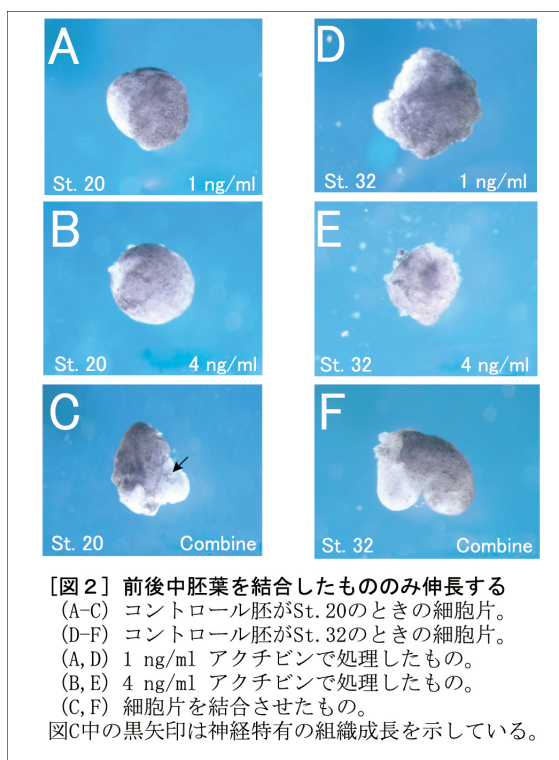
図 1B に示すように、RNA 抽出は外殖片操作より 90 分間おいたところで行った。細胞間のインタラクシオンは細胞が丸くなりだしてから 15-30 分程で起こることが一般的に知られている。そのため、丸くなるまでの時間を 1 時間としてそこから 30 分後に抽出を行えるよう設定した。

図 1C に示すように、サンプルの内訳は Tube1 が非伸長条件、Tube2 が伸長条件となるようにした。

前後の中胚葉組織を結合させた細胞片のみ CE を起こした

上記の実験系が本当に正しく機能するかどうかを確かめるため、図 1A, B に示す作業を通して行い、細胞片がどのような形質を示すか観察した。このとき切り出したアニマルキャップの個数は、アクチビン処理の濃度ごとに 10 個ずつとした。

コントロール胚がステージ 20 に到達したとき、単独で培養した細胞片は球状のかたまりとなった (図 2A, B)。一方、異なるアクチビン濃度で処理した細胞を結合させて培養した細胞片は伸長を起し、紡錘状の形状を示した (図 2C)。また図 2C 中の黒矢印に示すように、結合させた細胞片上皮細胞では神経特有の枝分かれしたような組織成長が観察できた。これは結合させた細胞片の方が伸長活動が盛んであることを示しており、これからも図 2C が中



軸中胚葉として、伸長活動により強い影響力を持っていることがわかる。

細胞片間の差異は後のステージになるほど顕著になった。コントロール胚がステージ 32 に到達したとき、単独で培養した細胞片は典型的な不整形表皮を形成したものの、球状を示すに留まった (図 2D, E)。一方、結合させて培養した細胞片はさらに伸長し、湾曲した形状を示した (図 2F)。その後も細胞片がバラバラになって死んでしまうまで観察を続けたが、目立った変化は起こらず、単独で培養したものについては双方とも伸長は起こらなかった。

以上の観察結果より、アクチビンによって誘導された前後中胚葉の組織を結合させた細胞片のみ C E が誘発されることが確かめられた。この結果は二宮らの論文 (Ninomiya et al., 2004) の内容と一致しており、これによってこの実験系が正しく働いていることが証明された。

77 の遺伝子配列がサンプル間で 2 倍以上の変動を示した

C E に関連する因子を見つけるために、上記の実験系を用いてマイクロアレイ用のサンプルを作成した。サンプルは、非伸長条件の細胞片 2 つより RNA 抽出したものと、伸長条件の細胞片 1 つより RNA 抽出したものの 2 種類を用意し

た (図 1C)。

このサンプルを用いて 2 色カラーズワップ法マイクロアレイ解析を行った。43803 配列を調べたが、そのうち 77 配列がサンプル間で 2 倍以上の変動を示した (サブリメンタリーデータ 1 参照)。77 配列のうち、64 配列が伸長条件の方で上昇しており (表 1)、残りの 13 配列は伸長条件の方で下降していた (表 2)。

遺伝子情報	発現比	Acc.#
Germes	30.84	AY172320
DEADSouth RNA helicase	29.37	AF190623
DAZ-like protein	20.02	BC097658
Xpat protein	13.14	BC072773
DAZ-like protein	12.60	BC097658
MGC80474 protein	6.69	CA793059
MGC84445 protein	5.59	BC081189
MGC84109 protein	4.94	CD328604
Hypothetical protein MGC68817	3.94	BC061674
Lectin type 2	3.92	AB061239
HES-related 1B	3.13	AB071434
Enhancer of split related protein-7	2.69	BC099326
Putative transcription factor DLL4	2.65	L09728
Enhancer of split related protein-7	2.54	BC099326
CDNA clone IMAGE:6318843	2.39	BC068918
Frizzled-8	2.37	AF033110
Heart and neural crest derivatives expressed 2	2.33	AF286645
MGC80232 protein	2.31	BC072847
MGC85232 protein	2.26	CB199276
CDNA clone IMAGE:4031167	2.18	BC084625
Epidermis specific serine protease	2.08	AB018694

〔表 1〕伸長条件で 2 倍以上の発現比を示した遺伝子
 非伸長条件と比べて、伸長条件の方で 2 倍以上強く発現した遺伝子の代表的なもの。この条件に適用ものは 64 配列あったが、遺伝子情報が明確に示されていないものは省略した。
 全ての遺伝子が載っている詳細なデータに関してはサブリメンタリーデータを参照すること。
 * Acc.#, Accession Number

77 配列のうち遺伝子名が明確に示されていたものを選び出し大きな変動を示した順に整理すると、上昇した遺伝子配列の上位 5 配列が生殖系列特異的に発現する遺伝子であることが分かった (表 1)。

遺伝子情報	発現比	Acc.#
Crystallin, beta B2	2.97	BC075252
unconfirmed	2.66	CA974467
unconfirmed	2.65	DT066671
unconfirmed	2.51	BM191386
unconfirmed	2.44	BF071865
unconfirmed	2.40	BJ086255
unconfirmed	2.38	BG438884
unconfirmed	2.32	CK800551
unconfirmed	2.26	BI314274
MGC82585 protein	2.21	BC073003
unconfirmed	2.10	BX849952
MGC84738 protein	2.06	BC074455
unconfirmed	2.05	BJ100432

[表 2] 非伸長条件で 2 倍以上の発現比を示した遺伝子伸長条件と比べて、非伸長条件の方で 2 倍以上強く発現した遺伝子。この条件に合うものは 13 配列あり、ここにすべて載せてある。“unconfirmed” とある遺伝子は、アレイ登録時に何の遺伝子か何のホモログかも分からなかった EST のことである。
* Acc.#, Accession Number

遺伝子データ

続いて、リストアップされた遺伝子配列から C E 現象に関連の高いものを選択するために、論文検索システム Pubmed や遺伝子配列検索システム BLAST 等のバイオインフォマティクスの手法を用いて、各遺伝子に関する詳しい情報を収集した。検索には遺伝子名、アクセッションナンバー、遺伝子配列などを用いた。有用な情報を得られた 22 遺伝子について以下に箇条書きで示す。また、上記方法を用いても、配列以上の情報が得られなかった遺伝子に関しては記載に値しないものとして割愛した。

<Germes>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で平均して 30.84 倍の発現を示した。本実験でも高い倍率で発現した遺伝子である。Germes は初期のアフリカツメガエル胚の植物極側に特異的な cDNA ライブラリーより単離された遺伝子である。対応する mRNA は 2851 b のサイズで、生殖質関連遺伝子特有の局在化パターンを示す。ORF は約 68 kDa のタンパク質をコードし、その中には 2 つのロイシンジッパーモチーフと、EF-hand ドメインを含んでいる。相同性の高いタンパク質は現在見つかっていない。in situ hybridization 解析により、卵形成の初期にミトコンドリア雲を通して植物極皮質に局在化し、初期発生が進行すると共に生殖質へ分離していくこと

が分かっている (Berekelya et al., 2003)。

野生型の *Germes* の過剰発現は、始原生殖細胞 (primordial germ cells : PGCs) の数を有意に減少させる。一方、2つのロイシンジッパーモチーフを欠損させた *Germes* Δ LZs を発現させても、PGCs の数を有意に減少させる。また、この *Germes* 変異体は PGC の生体内移動を禁止して、尾芽胚ステージで生殖質分布に異常をもたらすことも確認されている。この他にも、*Germes* にはダイニン軽鎖 d1c8a と d1c8b をコードしたシークエンスが存在することが確認されている (Berekelya et al., 2007)。

<DEADSouth RNA helicase>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で平均して 29.37 倍の発現を示した。DEADSouth は、アフリカツメガエル卵母細胞で局在化された RNA のスクリーニングより単離されたものである。Xcat3 と呼ばれ、eIF4A に関連した DEAD-box RNA 依存性ヘリケースのサブファミリーメンバーである。卵形成初期にミトコンドリア雲を通過して植物極側の皮質に局在化し、初期発生の間は細胞質に分布している。この mRNA は 3092 b のサイズであり、卵母細胞や PGCs の生殖質だけの範囲内で確認できる生殖細胞系に特有のものである。RNase プロテクションアッセイにより、卵とステージ 10 胚に存在していることが分かっている。成体では卵巣と精巣のみに発現している。また、DEADSouth は Xcat2 や Xdaz1 mRNA と同じ初期経路を辿っていることが分かっている (MacArthur et al., 2000)。

DEADSouth RNA の 3'-UTR には、3つのサブリージョンが存在していることも分かっている。リージョン A は生殖質では mRNA を定着させ、体細胞では mRNA の分解に参加する役割を担っている。リージョン B は mRNA の翻訳を強化している。そしてリージョン C はリージョン B と協同して生殖質での mRNA の定着に関与している (Kataoka et al., 2006)。胚内で Xcat2 と Xpat が存在する

状況下でのみ、*DEADSouth* RNA が卵母細胞の成熟生殖顆粒と関わることができると報告されている (Kloc et al., 2002)。

<DAZ-like protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で平均して 20.02 倍と 12.60 倍の発現を示した。2 つデータがあるのは、異なった配列を用いて解析したからである。*DAZ-like* は、ヒト Y 染色体にある *DAZ* 遺伝子 (*deleted in azoospermia*: 無精子症で削除される) の相同物としてマウスから単離された遺伝子である。マウス *DAZ* 相同遺伝子は常染色体にあり、17 番染色体に存在している。この遺伝子にコードされたタンパク質は *DAZ* 遺伝子の N 末端地域にコードされている 2 つのタンパク質に非常に良く似ている。*DAZ-like* の mRNA の転写はマウスのオスとメスの性腺にのみ確認されている。ただし、生殖細胞が不足している精巣では転写は確認されていない。また、マウスで Y 染色体にリンクしている *DAZ* 相同物は見つかっていない (Cooke et al., 1996)。

DAZ 遺伝子の相同物はアフリカツメガエルからも単離されている。その RNA は *Xenopus DAZ-like* (*Xdazl*) と名付けられ、ヒトの *DAZ*・脊椎動物の *DAZL*・ショウジョウバエのブルータンパク質に相応するタンパク質をコードしている。*Xdazl* mRNA は、卵母細胞のミトコンドリア雲と、植物極側皮質で確認されている。初期胚においてその mRNA は生殖質のみに局在化し、後のステージでは精巣の精原細胞と精母細胞で発現する。*DAZ* ファミリータンパク質は RNA 結合機能を持つ RNP 領域を含んでおり、*Xdazl* も *in vitro* で RNA 結合タンパク質として機能することが確かめられている。また、*Xdazl* を無精子症を示したブル変異ショウジョウバエに投与すると、スピンドルの形成やヒストン H3 のリン酸化と減数分裂の細胞分裂の完成など、ブル変異の表現型のレスキューが可能であることが分かっている (Houston et al., 1998)。

モノクローナル抗体を用いた調査では、*Xdazl* は成熟した精子以外ではオスとメスの生殖細胞

全ての時期に存在していることが示されている。また、初期胚では *Xdaz1* タンパク質は生殖質を含む特異的な組織には分布せずに、細胞質を通して分散していることが分かっている。ただし、その mRNA に関しては生殖質への局在が確認されている (Mita and Yamashita, 2000)。

ゼブラフィッシュを用いた研究から、シークエンス「GUUC」がゼブラフィッシュ DAZ-like タンパク質の標的となる RNA 配列であることが確認されている。そして、zDAZL タンパク質が生体内で DAZ モチーフを通してポリゾームと結合し、そのポリゾームとの関係が翻訳起動をするために不可欠であることが示されている。これにより、DAZ ファミリータンパク質は脊椎動物において直接目標 mRNA の翻訳をプロモートしていることが確認されている (Maegawa et al., 2002)。

X. tropicalis を用いた研究から、*Xtdaz1* の具体的な移動経路が明らかになっている。*Xtdaz1* mRNA はまずはじめに、卵黄形成前のステージ I にある核周囲 METRO (message transport organizer) 領域で発現する。ステージ III のときに植物極の皮質領域に局在化する。受精後に、*Xtdaz1* mRNA 島は集合し始め、8 細胞期の胚では植物極の谷間溝に限定されるようになる。ステージ 9 後期では、*Xtdaz1* mRNA が植物極側から胞胚腔底へと移動する。原腸形成の間、*Xtdaz1* mRNA を発現している細胞は受動的に深部内胚葉地域に持ち込まれ、それから原腸底で密接に発現し、神経胚形成時にもその発現は持続する。尾芽胚の初期には、*Xtdaz1* mRNA は後方側方内胚葉の部分で見つかり、ステージ 28 頃になると、成長と共に徐々に前方背側の位置に移動してくる。ステージ 35 にもなると、背側内胚葉に拘束されるようになり、ステージ 40 では *Xtdaz1* mRNA を発現している大部分の細胞は内胚葉の背側頂上にたどり着く。それは脊索に隣接した背側内胚葉であり、横方向にはそれ以上広がらない。いったん背側頂上で局在化されると、それ以降 *Xtdaz1* mRNA の発現は殆ど消える。このような一連の流れは、*Xenopus laevis* の *Xdaz1* と同じであることが確認されている (Sekizaki et al., 2004)。

また、ゼブラフィッシュでは卵の植物極側に存在していた DAZ-like mRNA のかなりの部分が

受精後の卵起動と共に皮質を通じて動物極側へ移動していき、卵割溝を形成するという報告もされている(Theusch et al., 2006)。

<Xpat protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で平均して 13.14 倍の発現を示した。Xpat はアフリカツメガエル原腸胚の植物極に特異的な cDNA より見つかった。単離された新しいクローンは生殖質の構成要素と一致した RNA 発現パターンを示し、*Xenopus primordial germ cell associated transcript (Xpat)* と名付けられた。mRNA は 4075 b のサイズで、その ORF は 35 kDa のタンパク質をコードしている。明確なホモログは示されていない。RNA は卵形成と初期卵割を通して植物極側に局在化される。原腸形成の間にこの mRNA を含んでいる細胞は胚内部へと動き、尾芽胚ステージでは前方背側方向へと移動する。いったん背側腸間膜が出来た後は、Xpat mRNA は観察されなくなる。しかし、のちに生殖隆起が出来はじめると再びそこに発現するようになる。この遺伝子が作用するためには 3'-UTR が必要であり、それがあることによって卵母細胞の植物極へ外因性 RNA を局在させることができると確認されている(Hudson and Woodland, 1998)。

Xpat-GFP を用いた実験から、卵母細胞のステージ後半に発現する Xpat-GFP は内在性の生殖質島のように円形が多粒子構造をとって集まることが示されている。さらに、これらの構造は培養環境の操作により異所的に生殖質様の組織を形成できることが分かっている。この異所的な Xpat-GFP 島は、主要な生殖質成分であるミトコンドリアを補填できることが確認されている。ただし、他の多くの生殖質特有の成分がこの時に発現していなかったため、これらの異所的な構造が必ずしも内在性生殖質と同一の構成を持つ訳ではないことも示されている。これらのことから、Xpat タンパク質には、生殖質構造の位置決めと維持に関して重要な役割があることが示唆されている(Machado et al., 2005)。

Xpat RNA アンチセンスを用いた in situ hybridization と、PGCs のタンパク質に特有の 2L-13 抗体を用いた免疫染色を行った研究から、ステージ 23-48 胚での予定始原生殖細胞 (pPGCs) と PGCs の正確な場所が示されている。その結果、pPGCs と PGCs のいくつかは、それらのステージの多くの胚で異所的な場所に観察されている。これより、生殖細胞系初期細胞の一部の直系が正しく生殖隆起に移動できないこと、そしていくつかの異所性 PGCs が tadpole ステージにおいてアポトーシスまたは壊死によって除かれることが確認されている (Ikenishi et al., 2007)。

<MGC80474 protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 6.69 倍の発現を示した。NIH-MGC Project (<http://mgc.nci.nih.gov/>) のもと、“NICHD_XGC_Emb1” という *Xenopus laevis* のステージ 10 全胚から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC80474 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 861 b である。

<MGC84445 protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 5.59 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_Eye1” という *Xenopus laevis* の成体の目から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC84445 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 2225 b である。

<MGC84109 protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 4.94 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_Brn1” という *Xenopus laevis* の成体の脳から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC84109 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 921 b

である。

<Hypothetical protein MGC68817>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 3.94 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_Lu1” という *Xenopus laevis* の成体の肺から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC68817 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 2504 b である。なお、“Hypothetical protein” というのは仮想のタンパク質という意味である。

<Lectin type 2>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 3.92 倍の発現を示した。*Xenopus Ca²⁺-dependent lectin (XCL-1)* 遺伝子とアフリカツメガエルのおタマジヤクシの尾部再生との関わりを調べた研究によって、*XCL-1* と関連のある *XCL-2 (Lectin type 2)* 遺伝子が単離されている。この研究から、*XCL-2* は主に中期から終期にかけての tadpole ステージや成体で発現し、再生尾部において顕著な増加を示すことが確認されている (Ishino et al., 2007)。

<HES-related 1B>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 3.13 倍の発現を示した。*Xenopus Hairy and Enhancer of split (HES) -related 1* は前神経外胚葉の cDNA ライブラリーのスクリーニングから得られた HES-related 転写抑制因子であり、3 つのクローンが存在する。そのうちの 1 つが *Xenopus HES-related 1-B (XHR1-B)* である。WRPW-bHLH 遺伝子ファミリーに属しており、特に尾芽胚ステージの予定中脳後脳境界線 (MHB: Mid-hindbrain boundary) 領域で発現する。発現の時期は他に知られている MHB 発現遺伝子 (*XPax-2* や *En-2* など) よりも早く、また *Xotx2* や *Xbgx-2* が境界を形成するよりも早い。mRNA 顕微注入実験においてドミナントネガティブ型 *XHR1* の過

剰発現により *XPax-2* や *En-2* の発現が減少し、野生型 *XHR1* を共発現することにより、それをレスキューできることが確認されている。また MHB 領域への野生型 *XHR1* の異所的な発現は *En-2* の発現を拡大する。これらの結果から、予定 MHB の領域化は従来考えられていたモデルとは異なり、*Xotx2* と *Xgbx-2* の発現境界の形成以前から始まっていること、およびその領域化に *XHR1* が必要であることが示唆されている (Shinga et al., 2001)。

XHR-1 の目標遺伝子は、*Enhancer of split-related* 遺伝子 (*ESR1, ESR3/7, ESR9*) と *Xenopus laevis cleavage 2 (XLCL2)* が確認されている。これらの遺伝子は *XHR-1* の直接的な標的である。また、*XHR-1* は自身をダウンレギュレートしていることも分かっている。*XHR-1* アンチセンスモルフオリノオリゴ (以下 MO) を使ったノックダウン実験と、*XHR1* mRNA の異所的な発現実験から、*XHR1* が予定 MHB 領域の *ESR* 遺伝子の抑制に中心的な役目を果たしていることが分かっている。この遺伝子は、*ESR* 遺伝子と違って Notch シグナルの影響を受けないことも確認されている (Takada et al., 2005)。

<Enhancer of split related protein-7>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.69 倍と 2.54 倍の発現を示した。2 つデータがあるのは、異なった配列を用いて解析したからである。Enhancer of split related (*ESR*) protein-7 は、*ESR-7* によってコードされるタンパク質である。タンパク質は WRPW-bHLH という *ESR* 遺伝子に共通する特徴的な構造をとっており、主に二量体として働く。*ESR-7* は前述した *XHR-1* にダウンレギュレートされ、Notch シグナルによってアップレギュレートされる。この遺伝子はステージ 31-32 頃の発生途中の神経系・非神経系外胚葉で発現する。*ESR-7* mRNA のインジェクションでは、アニマルキャップにおいて *X-Delta-1* と繊毛前駆細胞マーカーである α -*tubulin* RNA のレベルを減少させることが確かめられ、同様の現象が Notch レセプター変異体

を投与したときにも観察されている。一方、ドミナントネガティブ体である ESR Δ 7b をコードしている mRNA をアニマルキャップに発現させると、繊毛細胞前駆体の形成に有用な変化は起こらない。同系のクローンである ESR6e の変異体の mRNA を発現させた場合は、 α -tubulin の発現を強く促進する結果が得られている。なお、ESR 系遺伝子は、殆どの場合が Notch シグナルが活性化されているときだけ特定の組織で発現することが分かっている (Deblandre et al., 1999)。

ESR-7 は ESR-3 と同じものであることも分かっている。XHR-1 や Notch シグナルとの統一した作用モデルも報告されており、Notch シグナル・HES・ESR と MHB 形成の密接な関係が解明されてきている (Takada et al., 2005)。

<Putative transcription factor *DLL4*>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.65 倍の発現を示した。*DLL4* はホメオボックス遺伝子であり、*Drosophila Distal-less (Dll)* 遺伝子のアフリカツメガエルクローンとして単離されたものである。現在のところ、5 つのクローンが確認されている。そのうち *Xdll-3* と *Xdll-4* は同じサブファミリーに属しており、腹側前方頭部領域・頭蓋神経冠・セメント腺など、前外胚葉派生的な部分に強く発現する。詳細を示すと、*Xdll-3* は前脳・嗅覚腺・耳原基・鰓弓そして神経板のくちばし状の大半に発現している。*Xdll-4* は網膜・前脳・鰓弓に発現している。これらの遺伝子の働きが分かったことにより、少なくとも前脳発生の最初のステップは中胚葉からの誘導を必要としていないことも示されている (Papalopulu and Kintner, 1993)。

この遺伝子は、アクチビン処理を施したアニマルキャップを表層細胞でサンドイッチした外殖片でも確認されている。この発見により、頭蓋および顔面軟骨 (特に下顎軟骨) がアクチビン処理を受けた外殖片で誘導されることが分かっている。全胚での *Xdll-4* mRNA 発現を調べた結果では、ステージ 22-28 とステージ 35 とステージ 41 の前部で特に強く発現していることが分かっ

ている。また、*Xdl1-4*はマウスの *Dlx-2* 遺伝子と関連があり、*Dlx-2* 変異体マウスは下顎や顔面骨の著しい欠陥を示すことも確認されている (Furue et al., 2002)。

<cDNA clone IMAGE:6318843>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.39 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_0v1” という *Xenopus laevis* の成体の卵巣から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は IMAGE:6318843 という想定上のタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 1240 b である。

<Frizzled-8>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.37 倍の発現を示した。*Xenopus Frizzled-8* (*Xfz8*) は、マウスの *Frizzled-8* のアフリカツメガエル相同物をコードしているザイゴティックな発現を示す遺伝子である。*Xfz8* は初期原腸胚ではオーガナイザー領域の深部細胞（特に初期の内線するマージナルゾーン）に、後のステージでは前方外胚葉に発現する。*Xfz8* は *Xwnt-8* と協同して強い影響力を持つことが分かっている。腹側細胞への *Xfz8* mRNA の異所的発現は完全な二次軸構造を形成できる。逆に、背側細胞にドミナントネガティブ体である *Nxfz8* を発現させると、前後軸の劇的なショートニングが起こる。また、*Xwnt-8* による二次軸形成を *Nxfz8* で阻害することも出来る。アクチビン処理したアニマルキャップ細胞でも *Nxfz8* を用いると同様の結果になる。*Xfz8* mRNA によって作られた腹部二次軸には早い段階では *MyoD* と *cerberus* が、神経胚ステージでは *NCAM* や *XCG1*、*Xotx2* と筋肉アクチンのマーカーが観察されている。*Xfz8* による頭部の誘導は、*GSK3β* や *Xdishevelled* のドミナントネガティブ体によって阻害される。これらのことから、*Xfz8* が軸形成能を持っており、これらの影響が Wnt シグナル伝達経路を必要とし

ていることが明らかになっている (Deardorff et al., 1998)。

野生型の *Xfz8* を過剰発現させても、*Nxfz8* のときと同じように、C E を阻害することが確認されている。またいくつかのレスキュー実験から、*Nxfz8* と *Xdsh* の協同発現はC E 阻害をレスキューできることが分かっている。対照的に、DN-GSK3 では *Xwnt5a* や *Nxfz-8* によるC E 阻害をレスキューできない。これらのことから、*Nxfz-8* は canonical-Wnt のダウンレギュレートによって形態形成を阻害しているのではないと示唆されている (Wallingford and Harland, 2001; Wallingford et al., 2001)。

原腸形成に関係する働きとして、*Xfz8* が c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) を起動させて急激なアポトーシスを誘発しているという報告もされている (Lisovsky et al., 2002)。このアポトーシス細胞は神経溝ステージで活性化され、空胞形成時の脊索伸長と相関のある前後パターンにそって分布することが確認されている。軸索中胚葉外殖片においてこのアポトーシスを阻害すると、脊索の長さがコントロール胚に対してほぼ二倍になる。また、全胚においてアポトーシスを阻害した場合は、脊索の長さを減少させて胚がひどくねじれる様子が確認されている。このねじれの影響は脊索が既に欠如しているはずのオタマジャクシステージでも見られ、このとき脊索マーカーは通常のパターンで発現する。体節や神経板の伸長もこの影響を反映しており、体節がひどく混乱していることが確認されている。これらのデータより、脊索形成にはアポトーシスが必要であることが示されている (Malikova et al., 2007)。

<Heat and neural crest derivatives expressed 2>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.33 倍の発現を示した。*Heart and neural crest derivatives expressed 2* (*Hand2*) は、アフリカツメガエルの成体の心臓より作製した cDNA より単離された転写因子をコードする遺伝子あり、ヒト・ゼブラフィッシュ・ラット間に於いて、

高い相同性が維持された bHLH 領域を持つ。ツメガエル成体では肺・肝臓・脾臓・腸・胃で弱く、腎臓で強く、そして心臓で特に強く発現することが分かっている（骨格筋には全く発現していない）。全胚では、まずステージ 22 の前方腹側領域外側に斑状分布している細胞で発現する。その後、発達中の鰓弓や脈管叢の重要な構成組織の細胞で発現していく。ただし、成熟した血管では *Hand2* は検出されない (Smith et al., 2000)。

この遺伝子は、交感神経系のニューロンでも発現が確認されている。*Hand2* の発現量は、*Noggin* によって媒介される BMPs によって制御されていることが、ニワトリでは確かめられている (Howard et al., 2000)。

マウスでは、*Hand2* の下流に *Atrial Natriuretic Peptide (ANP)* 遺伝子があることが示された。さらに、*Hand2* はホメオボックスファクターの *Nkx2.5* と相乗作用で相互に働きかけていることが分かっている (Thattaliyath et al., 2002)。

<MGC80232 protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.31 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_0v1” という *Xenopus laevis* の成体の卵巣から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC80232 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 1195 b である。

<MGC85232 protein>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.26 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_Tad2” というステージ 62 の *Xenopus laevis* 全胚から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC85232 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズ

は 596 b である。

<cDNA clone IMAGE:4031167>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.18 倍の発現を示した。NIH-MGC Project のもと、“NICHD_XGC_Kid1” という *Xenopus laevis* の成体の腎臓から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は IMAGE:4031167 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 1419 b である。

<Epidermis specific serine protease>

この遺伝子は、本研究の中では伸長条件の方で 2.08 倍の発現を示した。*Xenopus Epidermis specific serine protease (Xespin)* はアフリカツメガエルセリンプロテアーゼをコードしており、ザイゴティックに転写される。通常の発生では、最初に発現するのがステージ 12.5 であり、その後の神経胚と尾芽胚において背側前方表皮領域に強く発現する。ごく弱いシグナルではあるが、ステージ 10 でも発現が確認されている。中期神経胚ステージまでは単純な前方局在化を示すが、これは *Xespin* の発現が隣接する地域のシグナルや、後方化シグナルによって制御されていることを示唆している。また、レチノイン酸と CA-レチノイン酸レセプターの過剰発現によって *Xespin mRNA* の転写が抑制されたことから、中枢神経系や表皮の前後パターンニングがアフリカツメガエル胚の一般的な内在性要因（レチノイド）を共有している可能性が示唆されている (Yamada et al., 1999)。

<Crystallin, beta B2>

この遺伝子は、本研究の中では非伸長条件の方で 2.97 倍の発現を示した。*Crystallin, beta B2*

は眼のレンズ特有のレンズ繊維細胞構造タンパク質をコードしている代表的な遺伝子である (Kerscher et al., 1995)。

レンズ以外の場所でも発見されており、RT-PCR 調査によってネズミ脳・ネズミ精巣・ウシ網膜・ヒト網膜での発現が確認されている。ネズミ肺・心臓・卵巣・膵臓・胸腺・腎臓・肝臓、ヒト脳・精巣での発現は確認されていない。広い生物で確認できる遺伝子であるが、その働きには多少の差異が存在している (Magabo et al., 2000)。

また、レンズにおける B2 を含む全ての Crystallin beta ファミリーは、カルシウムと結合する能力があることも報告されている (Jobby and Sharma, 2007)。

<MGC82585 protein>

この遺伝子は、本研究の中では非伸長条件の方で 2.21 倍の発現を示した。“Wellcome CRC pSK St 10.5” というステージ 10.5 の *Xenopus laevis* 全胚から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC82585 というタンパク質をコードしている。配列の相同性検索を行ったところ、“*Xenopus tropicalis cold shock domain containing C2*” という RNA 結合タンパク質をコードする mRNA と 80%の相同性を持つことが分かった。

<MGC84738 protein>

この遺伝子は、本研究の中では非伸長条件の方で 2.06 倍の発現を示した。NIH-MGC Projectのもと、“NICHD_XGC_Eyel” という *Xenopus laevis* の成体の眼から作成した EST 配列より単離されたものである。遺伝子は MGC84738 というタンパク質をコードしており、mRNA のサイズは 1535 b である。

考察

C Eは動物のボディプラン形成を担う重要な生命現象である。この現象を引き起こす因子は長い間はっきりしていなかったが、二宮らの報告内容(Ninomiya et al., 2004)から、Wnt/PCP と独立してC Eを引き起こしている内在因子が存在していることが予想できた。我々はそうした内在因子のリストアップを試み、その結果、C Eに特に関連していると考えられる因子を絞りこむことができた。また、伸長するアニマルキャップでは生殖系列遺伝子が発現するという、未だ報告されていない現象も観察できた。これによって、今後のC E研究や生殖系列の研究にとって重要なデータを作製できたと言えるだろう。

伸長条件・非伸長条件を作り分ける方法について

本研究を行うにあたって、我々はまず二宮らの論文(Ninomiya et al., 2004)を基にして伸長条件と非伸長条件の細胞片を作り分ける実験系(図1)を構築した。細胞片の観察結果(図2)から、アクチビン処理の濃度は、二宮らの論文(Ninomiya et al., 2004)とほぼ同じ、1 ng/ml と4 ng/ml の2種類が適切なものであり、各処理にかけた時間も妥当なものだったと言える。C Eを扱う研究をする上で、世界で最もシンプルな実験系を確立できたと考えている。

アニマルキャップを外殖体のままアクチビンで処理することによって伸長条件を作成することもできる(Oelgeschlager et al., 2003)。この場合、細胞の位置によってアクチビンの影響度合いが異なるので、アクチビンの濃度勾配を擬似的に作っているのだろう。また、外殖片が次第に丸くなりその内外でアクチビンにさらされる時間が異なってくることも、前後それぞれの中胚葉を作り出すことに貢献していると思われる。単に伸長条件を作り出したいときにはアニマルキャップごとアクチビン処理をしてしまう方が容易である。しかし、遺伝子スクリーニングの比較対象に、伸長しない系として非処理のアニマルキャップを用いると中胚葉関連の遺伝子ばかりが

同定されるであろう。同じく背側中胚葉片も伸長モデルとして良く用いられるが(Keller and Danilchik, 1988)、この場合も有効な比較対象は見当たらない。それ故、本研究で確立された実験系が今後、胚の伸長を扱った研究をする場合に重宝されると考えられる。

本実験系の精度を高めるために2つの改善点が挙げられる。1つ目は、図1に示した操作にさらなるネガティブコントロールとして、前-前、後-後の組織片を合わせた系を導入することである。また、細胞間のインタラクションは接する時間によって変わるため、RNA抽出までの時間を複数設定することで、より詳しい解析も出来たであろう。但し、マイクロアレイスクリーニングの分析作業が非常に困難になることも考えられる。2つ目は、一連の細胞操作に臨むにあたって十分な訓練を積んだ後に行うことである。解離再集合の操作を行うときにはできる限り丁寧に素早い作業を心がけ、細胞の損失を最小限に留める必要がある。また、最後の表層細胞で囲む作業も、顕微鏡下でのピンセット操作の精度が鍵となる。これらは、一朝一夕で会得できるものではない。今回、5回以上にわたるトレーニングの後に実験を行ったが、より多くの経験を積むことで精度が上がったかも知れない、という感想をもった。

2倍以上の発現比を示した遺伝子について

マイクロアレイ解析の結果、77個の遺伝子配列が伸長に関わる候補遺伝子として、まずリストアップされた。非伸長条件に対して2倍以上の発現比というのは生体にとって大きな差であり、その差を示したものはCEに関わる因子である可能性、もしくは実験系による影響を受けた遺伝子である可能性が非常に高い。この77配列の中からCEに純粹に関係している遺伝子を選び出すためには各遺伝子に対する見解をより深める必要がある。したがって、ここでは得られたデータの多い遺伝子についてそれぞれ意見を述べていく。

Germes はアフリカツメガエルに独特の遺伝子で、生殖系列遺伝子の代表的な存在である。*Germes* の gain & loss-of-function の実験結果 (Berekelya et al., 2007) から、この遺伝子が生殖細胞系に強く関係していることが分かる。そして、*DEADSouth* 等とは違い、直接的に生殖細胞の発生に関わっているようである。しかし CE との影響をみた研究は未だ発見できていない。よって、卵形成初期に植物極側生殖質へ移動するはずの *Germes* が、なぜ AC で発見されるのかは不明である。生殖質は発生が進むにつれて胚内を移動していくが、それでも動物極側に移動していくことが確認されたことはない。そのような遺伝子がマイクロアレイ解析結果の中で最も高い発現比を示したことは非常に驚くべきことであり、その原因の考察は後述する。

DEADSouth RNA helicase をコードしている遺伝子は、*Germes* と同じように生殖質に強く発現する遺伝子である。ただし、*DEADSouth* 自体が何かをしているというよりは、生殖質に発現する様々な遺伝子をそこへと定着させる意味合いが強いようである。この遺伝子がなぜマイクロアレイで強く発現してきたのか不明である。しかし、ステージ 10 の全胚で発現していたり、ステージ 48 の切片においてフロアプレートの下に存在していたりと、CE を起こす時期や場所の近くに観察されていることから (MacArthur et al., 2000)、何らかの関係がある可能性も考えられる。また、ヘリケースという RNA の折りたたみを制御する極めて重要な役割をもっている分子であり、体細胞では mRNA の分解に関わっていることから (Kataoka et al., 2006)、このタンパク質が生殖質以外でも重要な役割をもつ分子であり、CE にも強く関与しているのかも知れない。

DAZ-like も、他の生殖系列遺伝子と同じような発現をする遺伝子である。ヒト以外では *DAZ-like* 遺伝子は常染色体に位置しており、そのタンパク質は脊椎動物やショウジョウバエまでその役目が広く保存されている。それ故、動物界全般に於いて重要な役目を持っている遺伝子

であり、生殖細胞を作るだけでなく、様々な役目を担っている可能性が考えられる。また、*DAZ-like* は mRNA こそ生殖質に局在するが、初期胚ではそのタンパク質は細胞質を通して分散しているという報告もある (Mita and Yamashita, 2000)。この事実は、*Dazl* タンパク質が分泌タンパク質としての性質も持っていることを示唆している。細胞外への分泌経路が存在するならば、細胞の移動に関わったり、他のシグナル経路に関わったりすることが考えられる。

ゼブラフィッシュでは、卵活性と同時に *Daz-like* RNA の大部分が動物極側へ移動する (Theusch et al., 2006)。ヒトやマウスではこの様な現象は観察されていない。種によって、付加的な機能を担うことも考えられ、今回の伸長系における発現上昇も、それで説明がつくかも知れない。

Xpat は、他の生殖系列遺伝子と同様の発現パターンを示し、*Germes* と同じく明確なホモログが確認されていないツメガエルに特有の遺伝子である。アニマルキャップや動物極に発現しているという報告は無いが、生殖質様の組織には *Xpat* が発現するという必要条件が成り立っているだけであり (Hudson and Woodland, 1998)、生殖質ではない細胞に *Xpat* が存在していることを否定することはできない。しかも、培養条件によって動物極にも生殖質様の組織を作り出せるという報告や (Machado et al., 2005)、予定始原生殖細胞と始原生殖細胞のいくつかが生殖質と異所的な場所に観察されたという事実もある (Ikenishi et al., 2007)。いずれにせよ、実際の全胚における遺伝子発現を調べる必要があると考えられる。

Lectin type 2 は、CE に関係している報告はないが、主に尾部再生において顕著に発現することが示されている (Ishino et al., 2007)。これは、体細胞性の幹細胞に深く関わりがあると考えられ、アニマルキャップの細胞はまさにそれに該当する。さらに、尾部形成に伸長反応が不可欠であること (Agathon et al., 2003) からも、CE への関与が十分に考えられる。また、*Lectin*

type 2 が Ca^{2+} 依存性であることから (Ishino et al., 2007)、C E を引き起こす Wnt/ Ca^{2+} シグナル伝達経路 (Webb and Miller, 2006) に関わっている可能性も高い。

Lectin type 2 遺伝子は *XCL-2* と略されるが、同様の略称を用いるもので C E に関わっていると報告されたものも存在した (Cao et al., 2001)。しかしこれは X-Lectin 系列ではなく、BLAST を用いて検索したところ配列もまったく異なったため、別の遺伝子であった。

HES-related 1B と *ESR-7* について。MHB 形成には Notch シグナルが関わっており、*HES* や *ESR* にはその標的遺伝子として働き得る (Takada et al., 2005)。Notch シグナルは原腸形成時にも確認されている (Caprioli et al., 2002)。それ故、*HES-related 1B* と *ESR-7* が C E に関わっている可能性が考えられる。一方、今回の混合条件において後方脳構造にあたる MHB が誘導されたために、*HES-related 1B* と *ESR-7* が発現しただけの可能性も考えられる。全胚における両遺伝子の原腸領域における発現を確認する必要があるだろう。

DLL-4 は、前方外胚葉派生的な組織に強く発現する遺伝子である (Papalopulu and Kintner, 1993)。*XHR-1* や *ESR-7* よりも更に前方である前脳や鰓弓の領域で発現することから、これも C E に直接影響を及ぼしていることは考えにくい。さらに、アクチビン処理をしたアニマルキャップを表層細胞でサンドイッチした外殖片でもこの遺伝子の発現が確認されていることから、今回の実験系で上がってきた *DLL-4* に関してもアクチビン処理由来である可能性が高い。ただし、伸長条件において 2.65 倍の発現比を示したことに 대해서는 考慮する必要がある。*XHR-1* や *ESR-7* についても同様であるが、前方組織だけが必要なのであれば非伸長条件でも同じ度合いで発現しても良いはずである。もし、伸長条件においてこれらの遺伝子が二次的に外胚葉において誘導されるのであれば、C E の研究をする上では、外胚葉で囲まない方が理想的なのかも知れない。

Frizzled-8 (Fz8) は、今回のマイクロアレイ結果の中で最も C E に関係性が高いと考えられる遺伝子である。*Fz8* が存在する場所や、Gain & Loss-of-function の実験がともに胚の劇的なショートニングを引き起こしたことから (Deardorff et al., 1998; Wallingford and Harland, 2001; Wallingford et al., 2001)、この遺伝子が C E に関連していることは間違いないと思われる。また、Wnt シグナルと密接な関係性を持ち、canonical-Wnt と non-canonical-Wnt 双方への影響力を持っていることが分かっている。

Nxfz8 (ドミナントネガティブ) を用いた表現型の観察より、*Fz8* のタンパク質レベルでの影響は分かった。しかし、Xfz8 M0 を用いた実験の報告はされていない。例えば、ホメオボックス遺伝子である *Siamois* や *Twin* の場合、ドミナントネガティブを用いた処理 (Kessler, 1997) と、M0 を用いた処理 (Ishibashi et al., 2007) では異なる結果を示す。なぜなら、ドミナントネガティブは全胚への不活性型タンパク質の過剰発現に過ぎず、本来の働きをみる指標にしかならないからである。したがって、Xfz8 M0 を用いたときの影響も観察する必要があると考えられる。

面白いことに、野生型 *Xfz8* は過剰発現させても、抑制したときと同じように、背側がショートニングした表現型が得られる (Wallingford and Harland, 2001; Wallingford et al., 2001)。*Xfz8* の適切な量の発現が C E 現象に必要なのかも知れない。

また、*Frizzled-8* が起動することにより急激なアポトーシスが誘発されるとの報告もある (Lisovsky et al., 2002)。アポトーシスはツメガエルの脊索形成に必要であり (Malikova et al., 2007)、何らかの関係があるのかも知れない。

Hand2 は、成体の内臓や鰓弓、脈管叢で多く発現していることから、中胚葉で主に発現する遺伝子だと考えられる (Smith et al., 2000)。しかし、前方腹側領域や鰓弓というのは C E を起こ

す中軸中胚葉ではない。更に、*XHand2* を whole mount in situ hybridization で解析した報告では、脊索や背側方面には一切発現していない(Smith et al., 2000)。このことから、胚内で *Hand2* が C E を引き起こしているという可能性は極めて低いと言えるであろう。

Xepsin は、背側前方表皮領域にザイゴティックに発現する遺伝子である。名前にも示される通り、表皮特異的に発現し、酵素活性部位にセリン残基を持ったタンパク質分解酵素である(Yamada et al., 1999)。神経板や脊索には発現が確認されていないことから、直接 C E を引き起こす因子である可能性は低いと考えられる。しかし、*Xepsin* が発現している頭部から前後軸方向にかけての表皮というのは、C E を起こす中軸中胚葉と非常に近い位置にあたる。また、レチノイドを共有して中枢神経系と表皮の前後パターンニングを決定している可能性が示唆されている(Yamada et al., 1999)ことから、*Xepsin* によって作られた表皮の存在が C E に貢献している可能性も考えられる。

PN-1 というセリンプロテアーゼインヒビターは C E に関わっており(Onuma et al., 2006)おり、また、別のセリンプロテアーゼである *xHtrA1* は胚の後方中胚葉の形成に強く関わっている(Hou et al., 2007)。このことから、*Xepsin* というセリンプロテアーゼも C E に対して何らかの影響を及ぼしている可能性も十分に考えられる。

Crystallin beta B2 は、C E を起こした条件の方で 2.97 倍の発現減少が確認された遺伝子である。脊椎動物全般で確認され、レンズを始めとした多岐にわたる組織に発現している(Kerscher et al., 1995; Magabo et al., 2000)が、C E との関連を示唆した報告は存在していない。生物間において機能は異なるが(Magabo et al., 2000)、初期発生における役目を調べたという報告は存在していない。したがって C E への関連は未知数と言える。*Crystallin beta* ファミリーが

カルシウム結合能力を有するという点 (Jobby and Sharma, 2007) から、カルシウムを介した Wnt シグナルが関係する可能性も考えられる。

その他、遺伝子名がまだ明確につけられていないものや単離されていないものに関しては既存の情報がないため、結果で示した以上のことは述べられない。しかし、それらはまだ解析されていない遺伝子である可能性も高く、配列と cDNA クローンが採取された組織などを考慮しながら検討していく価値は充分にある。

なぜ生殖系列遺伝子が強く発現したのか？

表 1 で示したように、伸長条件のアニマルキャップ解離再集合外殖片では、生殖系列に特異的に発現するはずの遺伝子が非常に強く発現していることが分かった。表に示さなかった遺伝子も含めると、実に 11 遺伝子が生殖系列由来である。生殖系列というのは、種の生活史を通して生殖細胞を維持し続ける細胞群であり、この非存在下では生殖細胞は形成されない。生殖系列細胞を含んだ細胞群は生殖質と呼ばれ、本来は一般の体細胞とは隔離されて発生を続けていく。その移動経路については、結果の “*Xtdaz1*” の所で示したとおり、最初はミトコンドリア雲を通して植物極側へ局在し最終的にはフロアプレートの真下にある生殖隆起に落ち着いていく。この事実から考えると、動物極から採取した細胞の外殖片で生殖系列遺伝子が 10 倍以上も揃って発現するということは驚くべきことである。ここでは、どうしてアニマルキャップを用いた系において生殖系列遺伝子が発現したのか、そして CE との関連はあるのか、についての見解を述べる。

第一に、これらの遺伝子が生殖系列のみで発現することが確実であれば、今回の実験系の中でアーティフィシャルに誘導されたことは明確である。アーティフィシャルであるとするれば、なぜ

この操作によって生殖系列遺伝子が発現してきたのだろうか。

単純な原因として、生殖質のコンタミネーション（以下コンタミ）が挙げられる。しかし、この可能性は低い。図 1 に示すように、今回の実験ではアクチビン処理した細胞を条件ごとにそれぞれ半分ずつ用いている。人為的なミスや異所的生殖質の存在によって解離細胞に生殖質がコンタミしていたとすれば、全てのサンプルにおいて生殖系列遺伝子が発現してくるはずである。そうならなかったことを考えると、単なるコンタミが原因ではなからう。

次に考えられるのは、アニマルキャップ再集合体がザイゴティックに生殖系列遺伝子を発現した可能性である。その原因は 2 つ考えられる。1 つ目は、実験操作によって生殖系列遺伝子をふくむ何らかのシグナル伝達経路が ON にされたという流れである。アニマルキャップ細胞は解離させると Ras/MAPK 経路が ON になり表皮化が阻害されるという報告があるため (Kuroda et al., 2005)、それと似たような現象が起こっているのではないかという考えである。2 つ目は、前後の位置価の成立によって生殖系列遺伝子が活性化されたという流れである。前述したように、体内で生殖質は最終的にフロアプレートの真下にある生殖隆起に落ち着く。一般的に体内で組織移動が起こるときには何らかの道標分子が必要とされるため、生殖隆起付近の組織でも何らかのシグナルが出ている可能性がある。そして、この生殖隆起は前後軸の丁度中央辺りに位置している。これらのことから、前後位置価が丁度中間になったところでは生殖質に対してのシグナルが発せられているのではないかと仮定できる。つまり、今回の実験で前後の組織を繋げたことで中間的な位置価が生まれ、それによって付近の細胞で生殖系列遺伝子が活性化されたのではないか、という考え方ができる。

最後に、それらを統合した原因が考えられる。*Xpat* の研究から、PGC のいくつかは異所的な場所に存在し、異所的な *Xpat* の強い発現は生殖質様（細胞内でミトコンドリア同士が集合する等の特徴がある）の組織を作り出せるとの報告がある (Machado et al., 2005)。つまり異所的生殖

質様細胞が誘導される条件が揃えば、そこに生殖質特異的な遺伝子が発現し得るということを示している。より具体的な言い方をすれば次のようなモデルで説明できる。 1) アニマルキャップに幾分かの異所的生殖質が混ざっており、それを解離することによって全てのサンプルに対して異所的生殖質が配布された。 2) 前方や後方だけの非伸長条件で培養したときには体細胞性の機構が働いて異所的生殖質は抹消された。しかし、前後の組織を組み合わせで培養したときには、生殖隆起が存在する場所のように中間的位置価が生まれ、その結果異所的生殖質が存続しうる環境になってしまった。 3) そこで生殖系列遺伝子が活性化され、その発現差が今回のマイクロアレイ結果を引き起こした。

いずれにせよ、これらの議論はまだ仮定の段階である。この真相を解明するためにはこの結果が再現性の高いものであるかどうかを確かめなければならない。アニマルキャップ外殖片において生殖系列遺伝子が発現しているのかどうか、前後の位置価を組み合わせたときのみ生殖系列遺伝子が発現するかどうかといったことを、マイクロアレイ以外の実験によって詳細に解析していく必要がある。もしこの現象が伸長条件のアニマルキャップに普遍的であると証明されれば、これを解明することで生殖系列の研究に対して新たな知見を与えることも十分に考えられる。

どの遺伝子を調べていくべきか？

これまで各遺伝子についての考えを述べてきたが、それらを統合し、最後にCEを引き起こす因子としてどの遺伝子に注目したら良いかを述べる。

今回挙げた遺伝子を Wnt 関連遺伝子や生殖系列遺伝子であるかどうか注目して分類した図を示す (図 3)。CE 研究のブレイクスルーとなり得る遺伝子を選ぶとすれば、図 3 の左下の領域に示される生殖系列遺伝子ではなく、且つ Wnt 関連遺伝子でもない分子に注目すべきである。図 3 の左下の領域に示した遺伝子群は CE と直接関連した報告がされておらず、それでいて CE との関連を強く否定できない遺伝子がいくつか含まれている。また、全胚より分離された cDNA クローンの配列には、まだ



機能すら解析されていない遺伝子が多く存在している。これらの中から、めぼしい遺伝子に注目して、解析を行っていくのが良いと考える。それ故、特に注目すべき解析候補としては、XCL-2、XHR-1B、ESR-7、DLL4、Xepsinなどが挙げられる。

謝辞

本研究を進行するにあたり、実験から論文執筆に至るまでの全課程において多大なるご指導ご鞭撻を賜りました黒田裕樹准教授に心から感謝いたします。また、アクチビンタンパク質を提供して下さった東京大学の浅島誠名誉教授と、マイクロアレイ解析にご協力下さいました浅島研究室所属の伊藤弓弦氏に深く御礼申し上げます。

最後になりますが、励まし合い、議論し合った黒田研究室所属の皆様に対して感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

参考文献

- Agathon, A., Thisse, C., Thisse, B. (2003) The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature*, 424, 448-452.
- Berekelya, L. A., Ponomarev, M. B., Luchinskaya, N. N., Belyavsky, A. V. (2003) Xenopus Germes encodes a novel germ plasm-associated transcript. *Gene Expr. Patterns*, 3, 521-524.
- Berekelya, L. A., Mikryukov, A. A., Luchinskaya, N. N., Ponomarev, M. B., Woodland, H. R., Belyavsky, A. V. (2007) The protein encoded by the germ plasm RNA Germes associates with dynein light chains and functions in Xenopus germline development. *Differentiation*, 75, 546-558.
- Cao, Y., Zhao, H., Grunz, H. (2001) XCL-2 is a novel m-type calpain and disrupts morphogenetic movements during embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.*, 43, 563-571.
- Caprioli, A., Goitsuka, R., Pouget, C., Dunon, D., Jaffredo, T. (2002) Expression of Notch genes and their ligands during gastrulation in the chicken embryo. *Mech. Dev.*, 116, 161-164.
- Cooke, H. J., Lee, M., Kerr, S., Ruggiu, M. (1996) A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 513-516.
- Deardorff, M. A., Tan, C., Conrad, L. J., Klein, P. S. (1998) Frizzled-8 is expressed in the Spemann organizer and plays a role in early morphogenesis. *Development*, 125, 2687-2700.
- Deblandre, G. A., Wettstein, D. A., Koyano-Nakagawa, N., Kintner, C. (1999) A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development*, 126, 4715-4728.

Furue, M., Myoishi, Y., Fukui, Y., Ariizumi, T., Okamoto, T., Asashima, M. (2002) Activin A induces craniofacial cartilage from undifferentiated *Xenopus* ectoderm in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15474-15479.

Goto, T., Davidson, L., Asashima, M., Keller, R. (2005) Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Curr. Biol.*, 15, 787-793.

Green, J.B., Smith, J.C., Gerhart, J.C. (1994) Slow emergence of a multithreshold response to activin requires cell-contact-dependent sharpening but not prepatterning. *Development*, 120, 2271-2278.

Green, J.B., Cook, T.L., Smith, J.C., Grainger, R.M. (1997) Anteroposterior neural tissue specification by activin-induced mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8596-8601.

Hou, S., Maccarana, M., Min, T.H., Strate, I., Pera, E.M. (2007) The secreted serine protease xHtra1 stimulates long-range FGF signaling in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Cell*, 13, 226-241.

Houston, D.W., Zhang, J., Maines, J.Z., Wasserman, S.A., King, M.L. (1998) A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* boule. *Development*, 125, 171-180.

Howard, M.J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X., Rohrer, H. (2000) The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Development*, 127, 4073-4081.

Hudson, C., Woodland, H.R. (1998) Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.*, 73, 159-168.

Ikenishi, K., Ohno, T., Komiya, T. (2007) Ectopic germline cells in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.*, 49, 561-570.

Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., Robertis, E.M., Kuroda, H. (2007) Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.*, in press.

Ishino, T., Kunieda, T., Natori, S., Sekimizu, K., Kubo, T. (2007) Identification of novel members of the *Xenopus* Ca²⁺-dependent lectin family and analysis of their gene expression during tail regeneration and development. *J. Biochem.*, 141, 479-488.

Jenny, A., Mlodzik, M. (2006) Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt. Sinai J. Med.*, 73, 738-750.

Jobby, M.K., Sharma, Y. (2007) Calcium-binding to lens betaB2- and betaA3-crystallins suggests that all beta-crystallins are calcium-binding proteins. *Febs J.*, 274, 4135-4147.

Kataoka, K., Yamaguchi, T., Orii, H., Tazaki, A., Watanabe, K., Mochii, M. (2006) Visualization of the *Xenopus* primordial germ cells using a green fluorescent protein controlled by cis elements of the 3' untranslated region of the DEADSouth gene. *Mech. Dev.*, 123, 746-760.

Keller, R., Danilchik, M. (1988) Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development*, 103, 193-209.

Keller, R. (2002) Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science*, 298, 1950-1954.

Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., Shih, J. (1985) The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 89 Suppl., 185-209.

Kerscher, S., Church, R.L., Boyd, Y., Lyon, M.F. (1995) Mapping of four mouse genes encoding eye lens-specific structural, gap junction, and integral membrane proteins: Cryba1 (crystallin beta A3/A1), Crybb2 (crystallin beta B2), Gja8 (MP70), and Lim2 (MP19). *Genomics*, 29, 445-450.

Kessler, D.S. (1997) Siamois is required for formation of Spemann's organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13017-13022.

Kloc, M., Dougherty, M.T., Bilinski, S., Chan, A.P., Brey, E., King, M.L., Patrick, C.W., Jr., Etkin, L.D. (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 241, 79-93.

Kuroda, H., Sakumoto, H., Kinoshita, K., Asashima, M. (1999) Changes in the adhesive properties of dissociated and reaggregated *Xenopus laevis* embryo cells. *Develop. Growth Differ.*, 41, 283-291.

Kuroda, H., Fuentealba, L., Ikeda, A., Reversade, B., De Robertis, E.M. (2005) Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev.*, 19, 1022-1027.

Lisovsky, M., Itoh, K., Sokol, S.Y. (2002) Frizzled receptors activate a novel JNK-dependent pathway that may lead to apoptosis. *Curr. Biol.*, 12, 53-58.

MacArthur, H., Houston, D.W., Bubunencko, M., Mosquera, L., King, M.L. (2000) DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in *Xenopus* related to eIF4A. *Mech. Dev.*, 95, 291-295.

Machado, R.J., Moore, W., Hames, R., Houliston, E., Chang, P., King, M.L., Woodland, H.R. (2005) *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning. *Dev. Biol.*, 287, 289-300.

Maegawa, S., Yamashita, M., Yasuda, K., Inoue, K. (2002) Zebrafish DAZ-like protein controls translation via the sequence 'GUUC'. *Genes Cells*, 7, 971-984.

Magabo, K.S., Horwitz, J., Piatigorsky, J., Kantorow, M. (2000) Expression of betaB(2)-crystallin mRNA and protein in retina, brain, and testis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 3056-3060.

Malikova, M.A., Van Stry, M., Symes, K. (2007) Apoptosis regulates notochord development in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 311, 434-448.

Mita, K., Yamashita, M. (2000) Expression of *Xenopus* Daz-like protein during gametogenesis and embryogenesis. *Mech. Dev.*, 94, 251-255.

Nieuwkoop, P.D., Faber, J. (1967) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), 2nd edn. *North-Holland Publishing, Amsterdam*.

Ninomiya, H., Elinson, R.P., Winklbauer, R. (2004) Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature*, 430, 364-367.

Oelgeschlager, M., Kuroda, H., Reversade, B., De Robertis, E.M. (2003) Chordin is required for the Spemann organizer transplantation phenomenon in *Xenopus* embryos. *Dev. Cell*, 4, 219-230.

Onuma, Y., Asashima, M., Whitman, M. (2006) A Serpin family gene, protease nexin-1 has an activity distinct from protease inhibition in early *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.*, 123, 463-471.

Papalopulu, N., Kintner, C. (1993) *Xenopus* Distal-less related homeobox genes are expressed in the developing forebrain and are induced by planar signals. *Development*, 117, 961-975.

Sekizaki, H., Takahashi, S., Tanegashima, K., Onuma, Y., Haramoto, Y., Asashima, M. (2004) Tracing of *Xenopus tropicalis* germ plasm and presumptive primordial germ cells with the *Xenopus tropicalis* DAZ-like gene. *Dev. Dyn.*, 229, 367-372.

Shinga, J., Itoh, M., Shiokawa, K., Taira, S., Taira, M. (2001) Early patterning of the prospective midbrain-hindbrain boundary by the HES-related gene XHR1 in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.*, 109, 225-239.

Smith, S.J., Kotecha, S., Towers, N., Mohun, T.J. (2000) *Xenopus* Hand2 expression marks anterior vascular progenitors but not the developing heart. *Dev. Dyn.*, 219, 575-581.

Tada, M., Concha, M.L., Heisenberg, C.P. (2002) Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 13, 251-260.

Takada, H., Hattori, D., Kitayama, A., Ueno, N., Taira, M. (2005) Identification of target genes for the *Xenopus* Hes-related protein XHR1, a prepattern factor specifying the midbrain-hindbrain boundary. *Dev. Biol.*, 283, 253-267.

Thattaliyath, B.D., Firulli, B.A., Firulli, A.B. (2002) The basic-helix-loop-helix transcription factor HAND2 directly regulates transcription of the atrial natriuretic peptide gene. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 34, 1335-1344.

Theusch, E.V., Brown, K.J., Pelegri, F. (2006) Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.*, 292, 129-141.

Wallingford, J.B., Harland, R.M. (2001) *Xenopus* Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development*, 128, 2581-2592.

Wallingford, J.B., Vogeli, K.M., Harland, R.M. (2001) Regulation of convergent extension in *Xenopus* by Wnt5a and Frizzled-8 is independent of the canonical Wnt pathway. *Int. J. Dev. Biol.*, 45, 225-227.

Webb, S.E., Miller, A.L. (2006) Ca²⁺ signaling and early embryonic patterning during the blastula and gastrula periods of zebrafish and *Xenopus* development. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763, 1192-1208.

Yamada, K., Takabatake, Y., Takabatake, T., Takeshima, K. (1999) The early expression control of Xepsin by nonaxial and planar posteriorizing signals in *Xenopus* epidermis. *Dev. Biol.*, 214, 318-330.

追加資料

本文中のサプリメントリーデータ（遺伝子データ）は、以下の Web ページにおいて閲覧できる。

<http://kuroda-lab.com/cvgene/>