

博士論文番号：0081015

体節中胚葉の分節境界をつくり出す誘導現象

佐藤 有紀

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(影山 龍一郎 教授)

平成15年1月31日提出

目次

要旨	3
はじめに	5
第一部	分節境界の形成は L-fng/Notch を介して誘導される	
序論	7
結果	10
考察	22
第二部	腹側から背側に向かって作用する誘導現象	
序論・結果	29
考察	40
おわりに	42
材料と方法	44
謝辞	47
参考文献	48
補足図	55

所属 (主指導教 官)	分子発生生物学講座 (影山龍一郎 教授)		
氏名	佐藤 有紀	提出	平成 15 年 1 月 7 日
題目	体節中胚葉の分節境界をつくり出す誘導現象		

要旨

脊椎動物のからだの中軸をなす脊椎は、いくつもの椎骨がからだの前後軸に沿って連なった構造をしている。脊椎骨のみならず、肋骨や骨格筋、血管などの成体におけるほとんどの繰り返し構造は、初期胚においてみられる体節の繰り返しパターンをもとにかたち作られる。体節は、前体節中胚葉 (Presomitic mesoderm、以下「PSM」と略す) と呼ばれるひとつづきの組織が分節化することにより形成される。分節化はからだの基本パターンをつくり出す上で最初に起こる重要な発生現象であるにもかかわらず、その機構は未解明であった。特に、PSM から体節が分離する際に現れる分節境界がどのようにして形成されるのかはほとんど解析されていない。そこで本研究では、予定分節境界 (「レベル-1」と定義) に着目した。

分節境界の形成機構を解明する手がかりを得るため、胚操作が容易であるニワトリ胚を用い、レベル-1 の組織がどのような性質をもつのかを調べた。レベル-1 を取り出し、境界を形成しない領域へ移植したところ、そこに異所的な分節境界が形成された。移植片は、分節境界の両側に存在している場合と、境界の後側のみに存在している場合の 2 通りの局在パターンを示した。前者で形成された分節境界は、移植片内に自律的に形成されたものである。一方後者は、本来は境界を形成しないはずの宿主組織が境界を形成していたことから、移植片により誘導されたものであることがわかった。移植片が異所境界の後側のみに存在していたことから、正常発生過程において、レベル-1 のすぐ後側の部位に分節境界の形成を誘導する活性が存在していることが明らかになった。

Lunatic-fringe (以下、「L-fng」と略す) はレベル-1 の後側において発現していることから、分節境界誘導活性と何らかの関わりがあることが期待された。そこで、分節化過程における L-fng の役割を知るため、L-fng の発現境界をレベル-1.5 につくり出した。その結果、L-fng を強制発現させた移植片の前側に、異所的な分節境界が形成された。この結果から、分節境界の誘導過程に L-fng が関わるということがわかった。L-fng は Notch 受容体を糖鎖修飾する糖転移酵素である。L-fng が発現している細胞において Notch が活性化している可能性

が考えられたため、恒常的活性型 Notch を用いて L-fng と同様の操作を行い、検証した。その結果、L-fng の場合と同様に Notch 活性化細胞の前側に異所的な分節境界が形成された。すなわち分節境界の誘導は、Notch シグナリングを介して引き起こされることが明らかになった。Notch1 およびそのリガンドの Delta1 は PSM 全体で発現しており、その発現パターンからは Notch シグナリングが活性化している部位を知ることはできなかった。以上の結果は、Notch シグナリングがレベル-1 の後側部位に限局して活性化していることを示唆している。

正常な分節化過程において、境界誘導能はレベル-1 の後側のみに見える。レベル-1 の後側に位置している細胞は、どのようにしてこの誘導能を獲得するのだろうか？この疑問に答える手がかりを得るため、本来は境界を形成しない領域の組織をレベル-1 の環境下へ移し、影響を調べた。その結果、移植片はホスト胚と同じ位置で分節境界を形成した。移植片の腹側には、完全に除去することができなかったホスト胚の体節組織が残っていた。ホスト胚の体節組織を完全に除去できた場合には、移植片に分節境界は形成されなかった。これらの結果から、レベル-1 の腹側部位には、その背側に分節境界を誘導する何らかの活性が存在している可能性が示唆された。

レベル-1 の腹側部位がその背側に分節誘導することを直接的に検証するため、レベル-1 の腹側部位のみを取り出し、境界を形成しない領域へ移植した。その結果、異所的な分節境界が背側に誘導された。すなわち、腹側から背側に向かって分節誘導が起こることが証明された。しかし、レベル-1 の背側部位を移植片として用いた場合にも同様の分節誘導活性を示したことから、腹側部位のみが特別な誘導能を有しているわけではないことが判明した。異所境界は必ず移植片の背側のみ形成され、腹側には形成されないという特徴を示した。つまりこの誘導シグナルは、腹側から背側へ一方向に伝わるという性質を持つ。

以上の研究から、分節境界は誘導現象により形成されること、この誘導シグナルには前後軸に沿って伝わるものと、背腹軸に沿って伝わるものの2種類あることが明らかになった。境界誘導能をもつ細胞は、レベル-1 の後側部位に局在している。この部位から発せられる境界誘導活性を「セグメンター (segmenter)」と名付けた。セグメンターの活性は Notch シグナリングを介する。本研究ではこれらの知見をもとに、PSM の3次元構造内において分節境界がどのようにして構築されていくのかを考察した。

はじめに

動物のからだにはさまざまな繰り返しパターンが見られる。昆虫の腹部や肢などの節構造は、もっとも身近に見られる繰り返し構造の例である。昆虫だけでなく、われわれ脊椎動物のからだにも繰り返し構造はある。これらの繰り返し構造を「分節」と呼ぶ。分節構造は、動物のからだが生なやかに運動するのを可能にしている。

本研究では、脊椎動物の初期発生過程において見られる体節中胚葉の分節境界がどのようにして形成されるのかに注目した。ニワトリの胚操作技術を駆使した解析の結果、分節境界の形成過程において誘導現象が起こることを見いだした。この誘導シグナルには、前後軸に沿って伝わるものと、背腹軸に沿って伝わるものがあることが明らかになった。これらの誘導現象をもとに、PSMの3次元構造内にどのようにして分節境界が構築されていくのかについて、考察を試みた。

本論文は前後軸に沿って起こるものと背腹軸に沿って起こるものについて別々にまとめ、二部構成の形式をとった。なお、本研究を遂行するにあたり用いた材料および方法は、第二部末に記した。

第一部

分節境界の形成は L-fringe/Notch を介して誘導される

序論

脊椎動物のからだの中軸をなす脊椎は、いくつもの椎骨がからだの前後軸に沿って連なった構造をしている。成体における脊椎骨の繰り返しパターンは、初期胚においてみられる体節中胚葉の繰り返しパターンに従う。脊椎骨のみならず、肋骨や骨格筋、血管などのからだにみられるほとんどの繰り返し構造のもととなるのが、体節である。体節は前体節中胚葉 (Presomitic mesoderm、以下 PSM と略す) と呼ばれるひとつづきの組織が分節化することにより形成される。分節化は PSM の前側から起こり、ニワトリ胚の場合およそ 90 分間、マウス胚の場合はおよそ 120 分間ごとに 1 対の体節が形成される。

体節はその分節パターンを保ったまま、異なる 3 種類の組織 (皮節、筋節、硬節) に分化する (図 1B)。皮節は背側の真皮を、筋節は体幹部すべての骨格筋を、そして硬節は脊椎骨および肋骨を形成すると言われている (Huang et al., 2000)。ただし肋骨の由来に関しては諸説あり、肋骨の近位部が硬節から、遠位部は筋節から形成されるという実験結果もあることから (Kato and Aoyama, 1998)、結論はまだ出ていない。体節は筋骨格系のみならず、中枢神経系の分節パターンの確立にも積極的に関わっている。例えば、脊髄神経節は必ず各体節の前側部分に形成される。これは、神経冠細胞 (neural crest) が移動する際に、体節の後側を通過するのを避ける性質があるためである (Krull et al., 1997)。さらに体節は、血管のパターニングにも関わっている。各体節の間に形成される血管 (intersomitic vessel) は、体節からのシグナルにより、秩序だった走行パターンを確立する (Graef et al., 2001)。

このように、体節がそれぞれの組織に分化するまでの分子機構はかなり理解されるようになった。一方で、分節化過程の分子機構はほとんど解明されていなかった。しかしながら、近年のノックアウトマウスやゼブラフィッシュ変異体の解析から、Notch 受容体を介するシグナル伝達経路が分節化に必要であることがわかってきた (*Notch 1* Conlon et al., 1995; *RBP-1k* Oka et al., 1995; *Delta-like 1* Hrabe de Angelis et al., 1997; *Lunatic-fringe* Zhang and Gridley, 1998; Evrard et al., 1998; *Presenilin 1* Wong et al., 1997; Shen et al., 1997; *Delta-like 3* Kusumi et al., 1998; *Hes7* Bessho et al., 2001; see review, Saga and Takeda, 2001)。これまでの解析から、Notch シグナリングは「分節時計 (Segmentation Clock)」として働いていると考えられている。「分節時計」とは、1976 年に Cook らによって提唱された分節化現象の理論モデル「Clock and Wave Front」で存在することが予想された機構である。Clock and Wave Front モデルは、PSM が後方へと伸長しながら、かつ前方から周期的に分節化していく現象を巧みに説明している (Cooke, 1998)。Clock and Wave front モデルの要点は次の 2 つである。1) 分節パターンがまだ決まっていない (若い) PSM では、常に「細胞状態が振動」している。

この振動は、発生段階を通じて早まったり、遅くなったりはしない。したがって、分節周期は常に一定である（分節時計：Segmentation Clock）。ただしこの振動はなんらかの機構により、一定の細胞集団内で同調するようになっている。2)発生が進み、振動を続けていた細胞がPSMの前方に達すると、振動が停止し、同調している細胞集団でひとつの体節を形成する。振動を停止する位置は、「Wave Front」と呼ばれる機構が制御している。1998年、このモデルにあてはまるような分子が、Notchシグナル伝達経路の下流因子で見つかった。bHLH型転写抑制因子 *c-hairy1* mRNA は、PSMの後側から前側に向かって、あたかも波が伝わるかのように、発現パターンを変化させる (Palmeirim et al., 1997)。この周期的発現変動は、「分節時計」がPSMに存在する証拠の一端であるという解釈がなされた (Dale and Pourquie 2000)。Notch1、L-fringe、RBP-J κ 、Hes7などのノックアウトマウスでは、ひとつひとつの体節の大きさや形が不規則になることから、Notchシグナリングは、個々の細胞が刻んでいる分節時計を同調させる役割を果たしていると考えられている (Saga and Takeda, 2001)。さらに分節時計を正確な場所で停止させる機構 (Wave Front) には、繊維芽細胞増殖因子 FGF によるシグナリングが関わっているようである。FGFシグナリングは、Wave Frontの後退を抑制し、PSMを未成熟な状態に維持する働きがある (Saga and Takeda, 2001; Dubrulle et al., 2001; Sawada et al., 2001)。

分節時計が停止し分節境界を形成する際に、そこでは何が起っているのだろうか？本研究ではこの疑問に答えるため、予定分節境界（以下、「レベル-1」と定義）と本来は分節しない領域の違いを解析することから始めた。レベル-1と分節しない部位とを直接的に比較するため、胚操作を効率良く行うことができるニワトリ胚を用いて移植実験を行った。その結果、レベル-1の細胞には分節化誘導能があることが明らかになった。これまでの分節化研究では、そのような誘導現象が起こっていることは全く知られていない。そこで、レベル-1の分節化誘導能の実体を詳細に解析し、正常な発生過程において、分節境界がどのようにして形成されるのかを考察した。

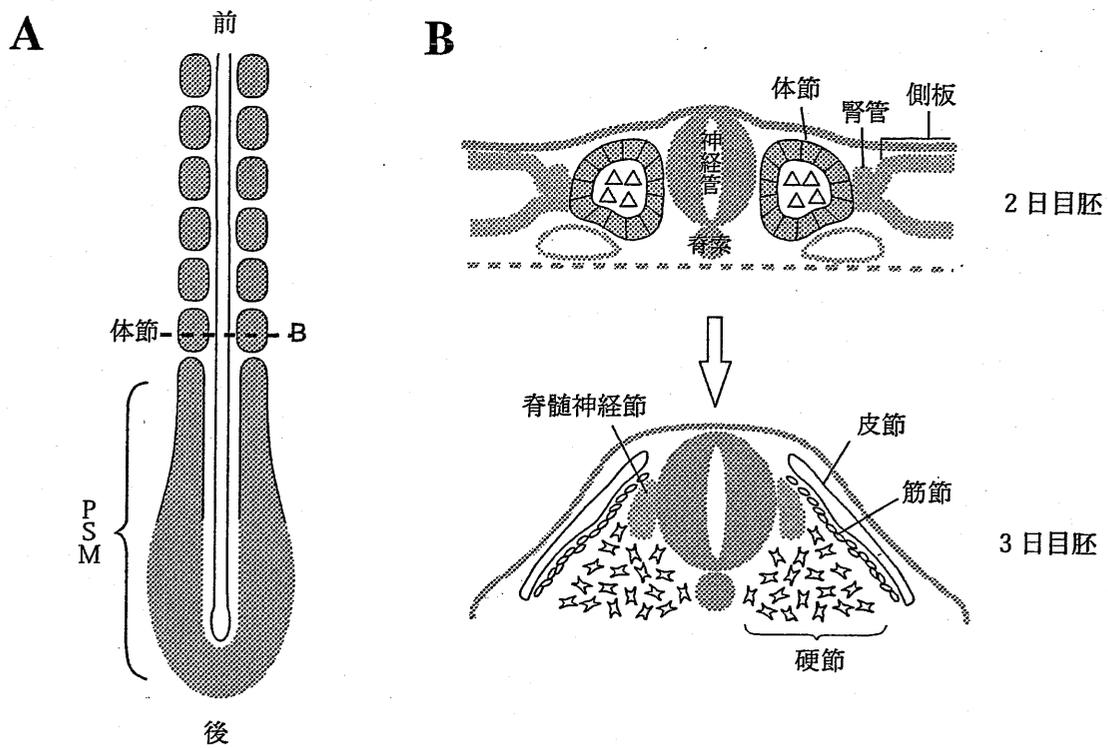


図1 体節形成過程の模式図

ニワトリ 2 日目胚体幹部を背側からみた模式図 (A)、および横断面 (B)。(A) PSM は主に間充織からなるひとつづきの組織である。その前側から約 90 分ごとに一個ずつ体節が形成される。(B) 体節は皮筋節、筋節、硬節に分化し、それぞれ将来の真皮、骨格筋、脊椎骨/肋骨を形成する。

結果

分節境界の形成過程にみられる形態的特徴

PSM は基本的に間充織細胞からなる一様な組織である。PSM において最初に観察される形態的な分節境界は、間充織の切れ目（ギャップ）として現れる。このギャップは、PSM の前端から後方へ 1 体節分の間隔をあけた部位に形成される（図 2A）。切れ目が形成されたのちに、その前側に位置する細胞が上皮細胞へと形態を変化させ、明確な分節境界が形成される。形成されたばかりの体節は馬蹄のような形態をしている。これは前側部分が間充織のままであるためだが、のちに上皮化し、球形の体節になる。本研究では形成されたばかりの分節境界を「レベル 0」、そこから後方へ 1 体節分の間隔をあけた部位を「レベル-1」と呼ぶ。ここで、実際の発生中の胚において、レベル 0 やレベル-1 をどのようにみきわめたのかを示す。明瞭な分節境界として観察できるレベル+1 の近傍を、GFP 蛍光を発する COS 細胞を移植することにより標識した（図 2B）。発生中の胚を外側から観察した限りでは、レベル 0 はレベル+1 ほど明瞭ではない。しかしながら、縦断切片にして観察すると、はっきりとしたギャップが形成されていることがわかる（図 2B'）。レベル-1 はまだ何も形態変化がおこっていない部位である。本研究では、形態的な分節境界がどのようにして形成されるのかを知るため、これからギャップが形成されるレベル-1 に焦点を絞った。

レベル-1 は分節境界を形成することが決定している

レベル-1 は分節境界を形成することが決まっているのかを調べるため、本来は分節境界を形成しない領域へ移植した。PSM では、細胞の移動や急激な細胞増殖や細胞死はおこらないということがすでに報告されている (Palmeirim et al., 1997; Primm et al., 1989)。したがって、レベル 0 からレベル-1 までの距離は、体節 1 個分の長さに相当すると考えられる。そこで分節直後の体節をメジャーとして用い、レベル-1 の位置を推測した。ドナー胚のレベル-1 をはさんだその前側と後側をそれぞれ蛍光色素の DiI および DiO で標識し、ホスト胚の本来分節境界を形成しない領域へ移植した。その結果、移植片内に分節境界が形成され、本来ならば 1 個の体節が形成される領域に、2 個の小さな体節が形成された（図 3A, B）。このような境界は、コントロール組織を移植した場合には形成されなかった（図 3C, D）。したがってレベル-1 はそこで分節境界を形成することが決定されており、分節しない領域の環境におかれても境界を形成できることがわかった。

レベル-1 の後側に隣接している細胞には境界形成を誘導する活性がある

分節境界の形成機構を知るためには、レベル-1 付近の細胞の性質をさらに詳細に調べる必要がある。前述したように、レベル-1 は境界を形成しない領域でも分節境界を形成できる。そこでレベル-1 付近のみを取り出し、本来は境界を形成しない部位（およその位置としては、レベル-1 とレベル-2 の中間。以下、そこを「レベル-1.5」と呼ぶ）に移植することで、レベル-1 由来の移植片がどのような挙動を示すのかを調べた（図 4）。この移植操作には、ドナーにウズラ胚を、ホストにニワトリ胚を用いた。その結果、本来は境界が形成されない領域に分節境界が現れ、小さな体節が 2 つ形成された（34 個体、図 4A）。その約半数の胚において、ウズラ細胞は境界の後側のみに存在していた（16 個体、図 4A' 矢頭）。境界の前側のホスト細胞は、本来分節境界を形成しない領域の細胞である。この領域にレベル-1.5、あるいはレベル-2 由来のウズラ組織を移植した場合には、異所的境界は形成されない（12 個体、図 4C）。したがってこの異所的境界は、レベル-1 由来の移植片により誘導されたと考えられる。一方、残りの約半数の胚では、境界の両側にウズラ細胞が存在していた（18 個体、図 4B）。つまりこの境界は、移植片内に形成された境界である。レベル-1 の位置を示す形態的な特徴はないため、レベル-1 の後側に位置している細胞のみを選んで取り出してくることは困難である。しかしながら、異所的に形成された境界の後側のみに移植片が存在していたことから、本来の分節化過程において、レベル-1 のすぐ後側に位置している細胞には、その前側の細胞との間に境界を形成させる誘導活性があることが明らかになった。

分節境界の形成は L-fng を介してひきおこされる

この誘導現象がどのような分子機構によりひきおこされるのかを知るため、Lunatic-fringe（以下、L-fng と略す）に注目した。L-fng mRNA はレベル-1 のすぐ後側の領域において明瞭な境界線をもった発現を示す（図 5A）。L-fng は Notch 受容体を修飾する糖転位酵素であることがすでに報告されている（Bruckner et al., 2000; Ju et al., 2000 May 11; Moloney et al., 2000; Panin et al., 1997）。Notch1 およびそのリガンドの Delta1 は PSM 全体で発現している（図 5B, C）。L-fng のレベル-1 における特徴的な発現パターンは、L-fng がこの誘導現象に関わっていることを示唆している。

分節化過程における L-fng の機能を知るため、L-fng cDNA を *in ovo* エレクトロポレーション法により PSM 内へ強制発現させ、分節化への影響を調べた。HH ステージ 7 から 8 の胚の PSM 予定領域（ヘンゼン結節の後方部位、(Catala et al., 1996)）へプラスミド溶液を注入し、電気パルスをかけた（図 6A）。約 24 時間後（HH ステージ 14）には、体節および PSM 全体で発現を観察できた（図 6B）。L-fng を強制発現させた結果、分節化は正常におこった（図 6C）。L-fng cDNA の 3' 末端側に融合した

flag タグに対するウエスタンブロッティングを行ったところ、L-fng タンパク質はエレクトロポレーションに用いたベクターにより確かに発現していた (図 6E, レーン 1)。ただし、エレクトロポレーションにより実際に遺伝子が導入された細胞は、全体の中の約 50% 程度である (図 6C)。

次に L-fng の発現のオン-オフ境界 (あるいは発現量の高低差がある境界) を異所的に作りだした場合の影響について調べた。この実験は、ショウジョウバエの Fringe が、発現している領域全体ではなく発現の境界部位において機能を示すという知見から着想した。エレクトロポレーションにより L-fng を強制発現させた胚の PSM 組織を取り出し、宿主胚のレベル-1.5 へ移植した (図 7A)。ただし、図 5A で示したとおり、L-fng mRNA はレベル-1.5 でも発現している (考察参照)。ドナー組織には、分節化誘導能を持つレベル-1 付近を避け、レベル-1.5 からレベル-2.5 を用いた。この操作の結果、L-fng を強制発現している移植片の前側に、異所的な境界が形成された (18/50 個体、図 7B)。GFP のみを発現させた組織を移植した場合には、このような異所的分節境界は形成されない (17 個体)。すなわち L-fng を発現している細胞は、その前側に分節境界の形成を誘導する。この結果は、正常な分節化過程において、L-fng が境界誘導現象に関わっている可能性を示唆している。

境界誘導は Notch シグナリングを介してひきおこされる

L-fng は Notch シグナリングを正に制御する機能をもつことがすでに報告されている (Bruckner et al., 2000; Ju et al., 2000; Moloney et al., 2000)。そこで次に、L-fng による境界誘導現象が Notch シグナリングを介してひきおこされるのかを検証した。恒常的活性型 Notch1 (Notch Δ E, Schroeter et al., 1998) を用いて L-fng と同様の操作を行い、レベル-1.5 に Notch 活性化細胞の境界を作りだした。その結果、Notch Δ E を発現している移植片の前側に、異所的な分節境界が形成された (18/27 個体、図 7D)。コントロールとして不活性型 Notch1 (Notch LNG) を発現させた組織を移植した場合には、影響はなかった (5 個体、図 7E)。つまり、Notch シグナリング活性化細胞は、L-fng 発現細胞と同様に、その前側に分節境界を誘導した。

以上の結果から、Notch シグナリングを介して分節境界が誘導されると結論づけた。Notch1 mRNA の発現は PSM 全体で見られるが (図 5C)、活性化する場所は L-fng により決定されるようだ。つまり正常な分節化過程では、L-fng が発現しているレベル-1 の後側部分の細胞において Notch シグナリングが活性化し、その前側に位置している細胞との間に形態的な境界を形成させると予想した (図 11A)。

境界形成誘導シグナルは前側方向のみに作用する

異所的な分節境界は、L-fng および Notch ΔE 発現細胞の前側に誘導される (図 8A 矢頭)。このとき後側には異所的な境界は形成されない (図 8A 矢印)。技術面での困難さにより、移植片の前後軸は必ずしもホスト胚の前後軸と一致していない。しかしながら、必ず移植片の前側のみに異所境界が形成されることから、誘導シグナルが作用する方向は、ホスト胚の前後軸に依存しているようである。

後方の PSM に分節境界は誘導されない

Notch シグナリングさえ活性化していれば、分節境界は誘導されるのだろうか？この疑問に答えるため、Notch ΔE を強制発現させた PSM の小片を、ホスト胚 PSM の後方領域 (レベル-4.5 付近) へ移植し、異所的な境界が誘導されるかどうかを調べた。その結果、異所的な境界は形成されなかった (4 個体、図 9)。この結果から、分節境界の形成には Notch シグナリングが活性化しているだけでは不十分であることがわかった。分節境界の誘導は前方の PSM のみにひきおこされ、後方の PSM にはおこらないようである。

小体節は前後極性を獲得している

分節後の体節は、それぞれが前後極性をもっている。そこで Notch シグナリング活性化による異所的境界誘導の結果、形成された小体節は、それぞれが正常な前後極性を獲得しているのかを調べた。各体節の後側コンパートメントを示すマーカー遺伝子として、*Delta1* (Henrique et al., 1995; Takahashi et al., 2000) を用いた。異所的に形成された小体節の後側半分において、異所的に *Delta1* が発現した (図 10A, A' 矢印)。このことから、Notch 活性化により形成された小体節は、正常な前後極性を獲得していることがわかった。すなわち、本研究において人工的な操作により形成された体節は、正常な分節化過程で形成される体節と同じであると結論づけられる。ただし星印で示すように、Notch ΔE を強制発現された移植片自身が *Delta1* を強く発現するため、もう一つの小体節の前後極性は不明である。このような *Delta1* の発現は、移植片を体節領域以外の場所へ置いた場合にも観察された (図 10B, 星印)。つまり、Notch 活性化細胞は *Delta1* の発現を維持するはたらきがあるようである。

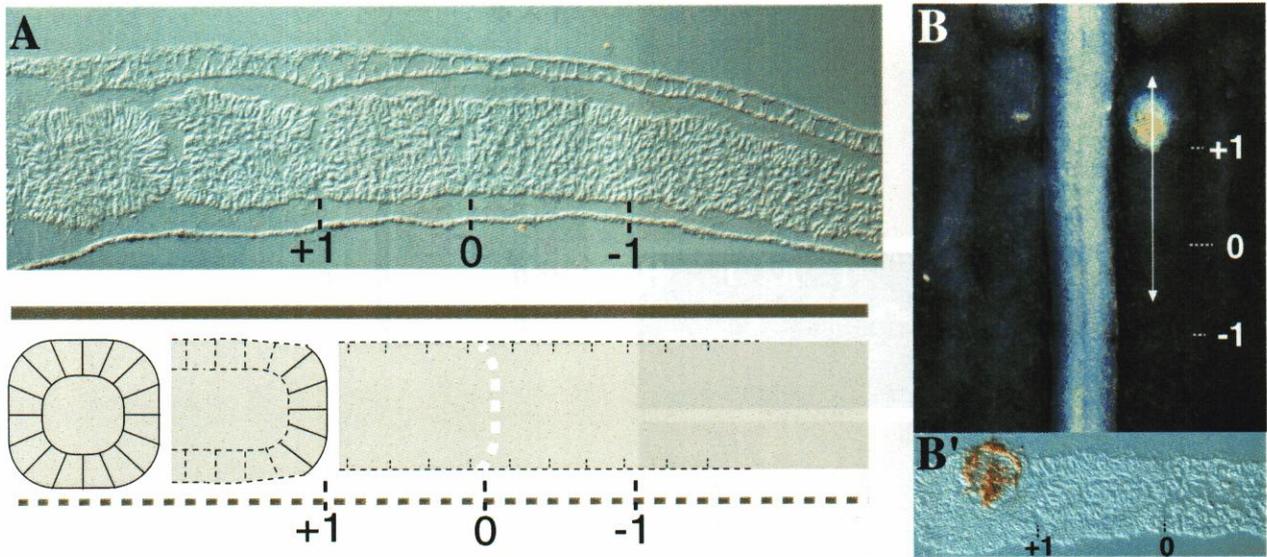


図2 予定分節境界の定義

(A) 2日目胚体幹部の縦断切片およびその模式図。微分干渉フィルターを通してパラフィン切片を観察した。左が頭側、右が尾側。わずかに見える間充織のすき間（ギャップ）が、形成されたばかりの分節境界（レベル 0）。ギャップの前側の間充織は上皮細胞へと形態を変化し、明瞭な分節境界が形成される（レベル +1）。レベル 0 より後方へ 1 体節分間隔をあけた部位を予定分節境界（レベル -1）と定義した。(B) 背側からみた体節および PSM。レベル +1 付近を GFP/COS 細胞により標識してある。この胚の縦断切片（白矢印部分）を B' に示した。茶色に染まっているのが GFP/COS 細胞。

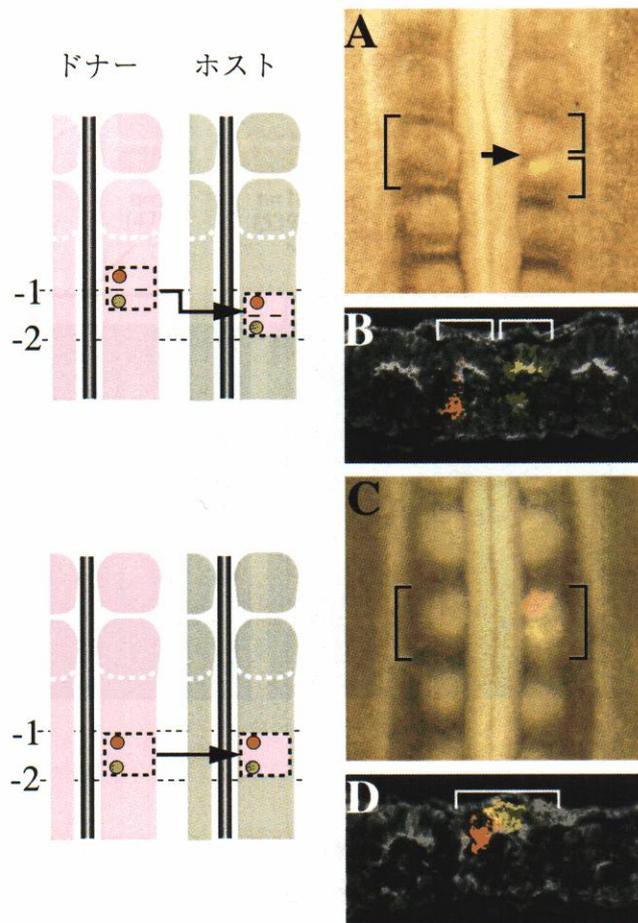


図3 レベル -1 は分節境界を形成することがすでに決定している

(A, B) ドナー胚のレベル -1 をはさんでその両側をそれぞれ DiI (赤色) および DiO (緑色) で標識した後、宿主胚の本来は境界を形成しない領域へ移植した。移植操作後約 5 時間経過した移植片の DiI および DiO 標識の間に分節境界が形成され (矢印)、2 つの小さな体節が現れた (括弧)。(C, D) ドナー胚の本来は境界を形成しない領域を DiO および DiO で標識した後、宿主胚の境界を形成しない領域へ移植した (コントロール)。(A, C) 背側からみた胚。上が頭側。(B, D) 移植操作を施した側の縦断切片。体節の形態をファロイジン染色 (アクチン繊維が染まる) により可視化した (白色)。左が頭側。

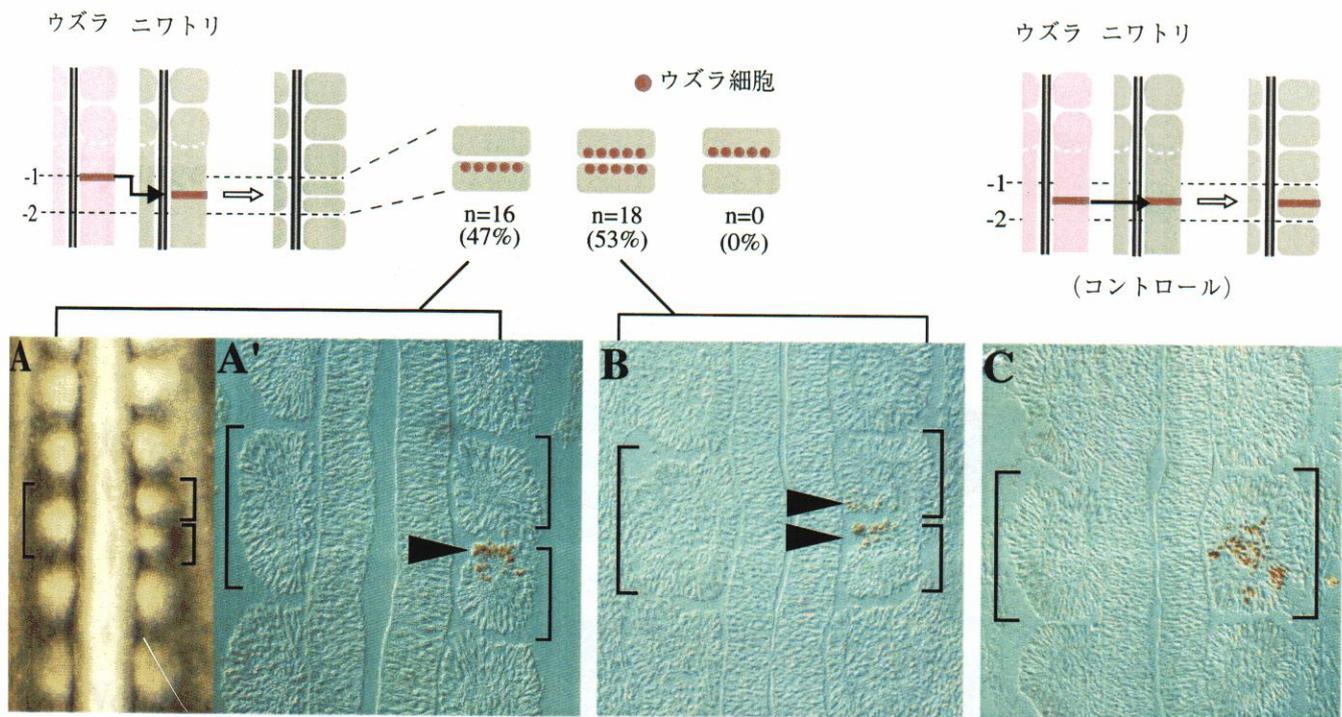


図4 レベル-1の後側部位からの誘導により分節境界が形成されたドナー胚（ウズラ）レベル-1のごく小さな組織片を取り出し、ホスト胚（ニワトリ）の本来は分節境界を形成しない部位（レベル-1.5）へ移植した。(A) 移植後、約5時間発生させたホスト胚。異所的に分節境界が現れ、2つの小さな体節（括弧）が形成された。(A') 移植片が異所境界の後側のみに存在していた場合（矢頭）。(B) 移植片が境界の両側に存在していた場合（矢頭）。(A', B, C) 水平切片。QCPN抗体染色によりウズラ細胞を検出した（茶色に染まっている細胞）。上が頭側。(C) コントロール（レベル-1.5の組織を-1.5へ移植）。

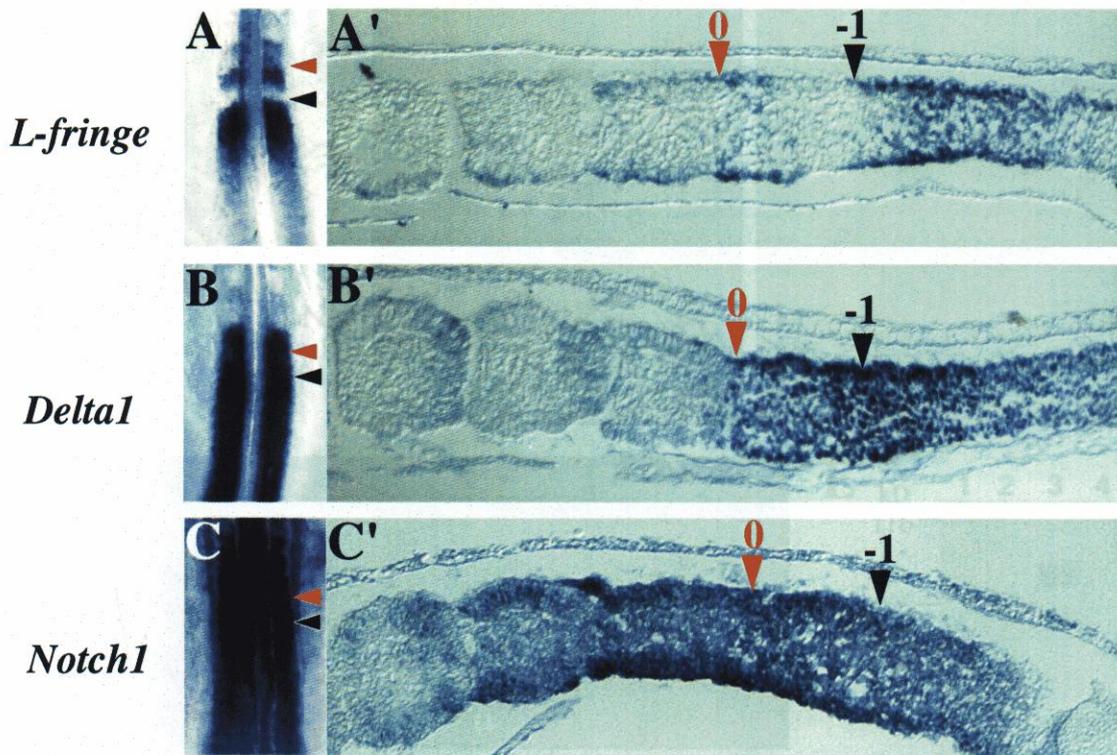


図5 PSMにおける *L-fng* (A) および *Delta1* (B)、*Notch1* (C) mRNA 発現パターン
L-fng はレベル -1 に一致する境界線をもった発現パターンを示す。赤矢頭はレベル 0、黒矢頭はレベル -1 を指している。(A-C) 背側から見た発現パターン。上が頭側。(A'-C') その縦断切片。左が頭側。

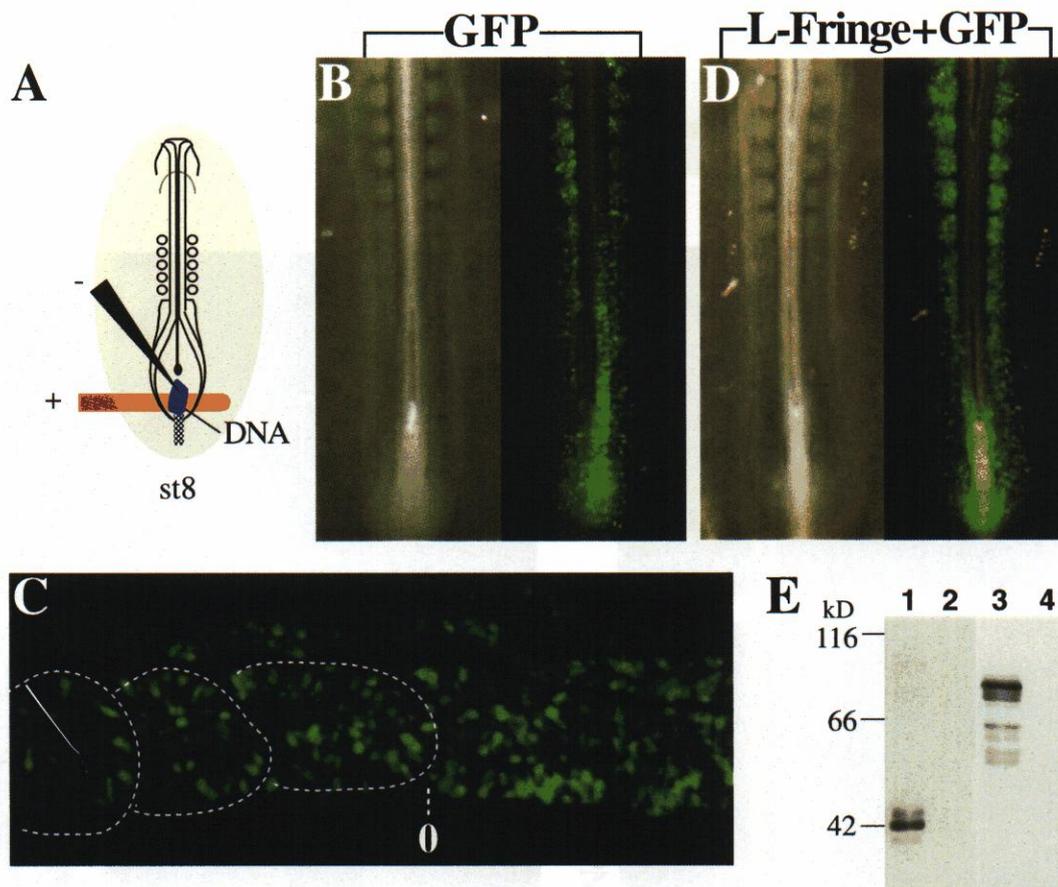


図6 *in ovo* エレクトロポレーション法による PSM への遺伝子導入

(A) ステージ7~8 胚の原条の前側（体節予定領域）に DNA 溶液を置き、プラス電極（白金、胚の下側に設置）とマイナス電極（タングステン）で挟み、電気パルスをかけた。(B) pCAGGS-GFP をエレクトロポレーション後、約 24 時間経過した胚。左は明視野で見た場合、右は励起光を当てた場合（両者は同一の個体）。PSM および体節において GFP シグナルが見られる。(C) GFP 導入胚の縦断切片。左側が頭側。(D) pCAGGS-Lfng を pCAGGS-GFP とともにエレクトロポレーション後、約 24 時間経過した胚。分節化は正常に起こっている。(E) ウェスタンブロッティングにより、エレクトロポレーションに用いた pCAGGS-Lfng および pCAGGS-NotchDE 由来のタンパク質の発現を確認した。L-fng/FLAG (42kDa, レーン 1) および NotchΔE/Myc (83kDa: プロセッシングを受けていないもの、70kDa と 63kDa: プロセッシングにより遊離して核内へ移行する断片 (Kopan et al, 1996), レーン 3) は、それぞれ抗 FLAG 抗体および抗 Myc 抗体により検出した。レーン 2 および 4 はコントロール (GFP のみを導入した COS 細胞)。

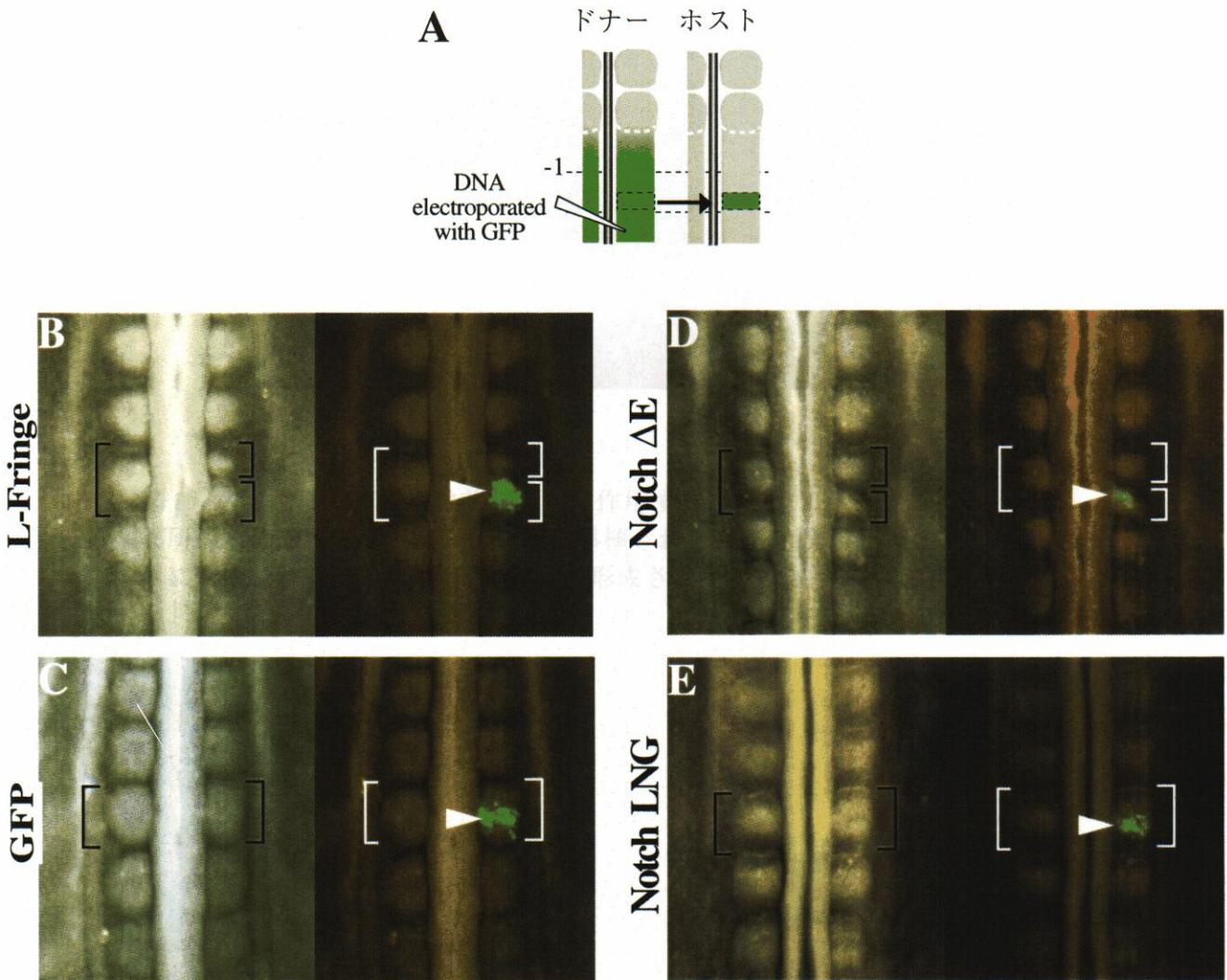


図7 L-fng/NotchΔE の発現境界に形態的な分節境界が誘導される

(A) L-fng の発現境界をつくり出すために行った操作の模式図。pCAGGS-Lfng を pCAGGS-GFP と共に導入したドナー胚 PSM のレベル -1.5 を取り出し、宿主胚のレベル -1.5 へ移植した。NotchΔE についても同様の操作を行った。(B) L-fng を強制発現している移植片 (矢頭) の前側に異所的な分節境界が形成された。(C) GFP のみを発現させたドナー胚のレベル -1.5 を移植した場合には、何の影響も見られない。(D) L-fng の場合と同様に、NotchΔE を強制発現させた移植片の前側に異所的な分節境界が形成された。(E) Notch LNG の場合、影響はなかった。(B-E) すべて移植操作後、約 5 時間発生させた胚。左は明視野で見た場合、右は励起光を当てた場合 (両者は同一の個体)。GFP 蛍光を発している組織が移植片 (矢頭)。

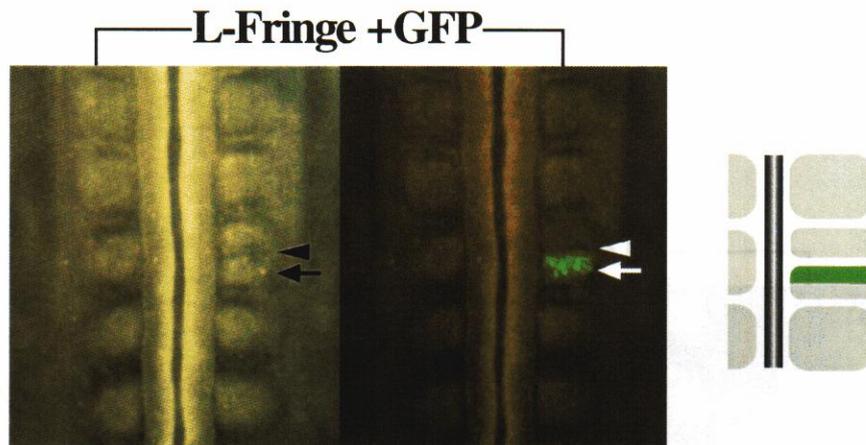


図8 境界誘導シグナルは前側のみに作用する
異所的な分節境界は、細い短冊状に移植された L-fng 発現組織の前側境界のみに形成され（矢頭）、後側境界には形成されなかった（矢印）。

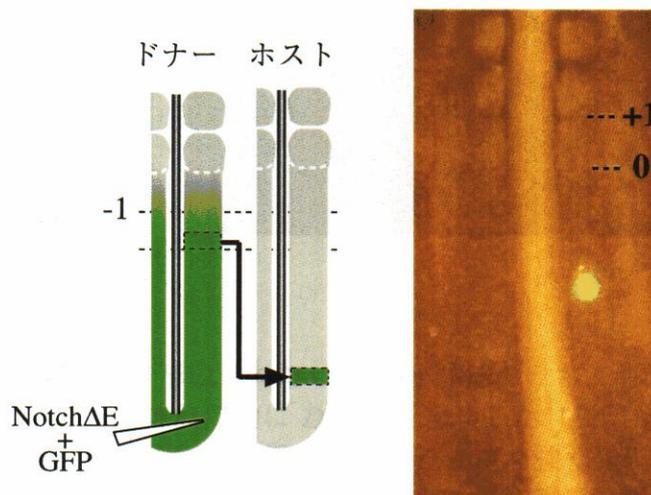


図9 若い PSM に境界誘導は起こらない
Notch ΔE を発現しているドナー組織を宿主胚のレベル -4.5 へ移植し、約 5 時間経過した胚。異所的な分節境界は形成されなかった。

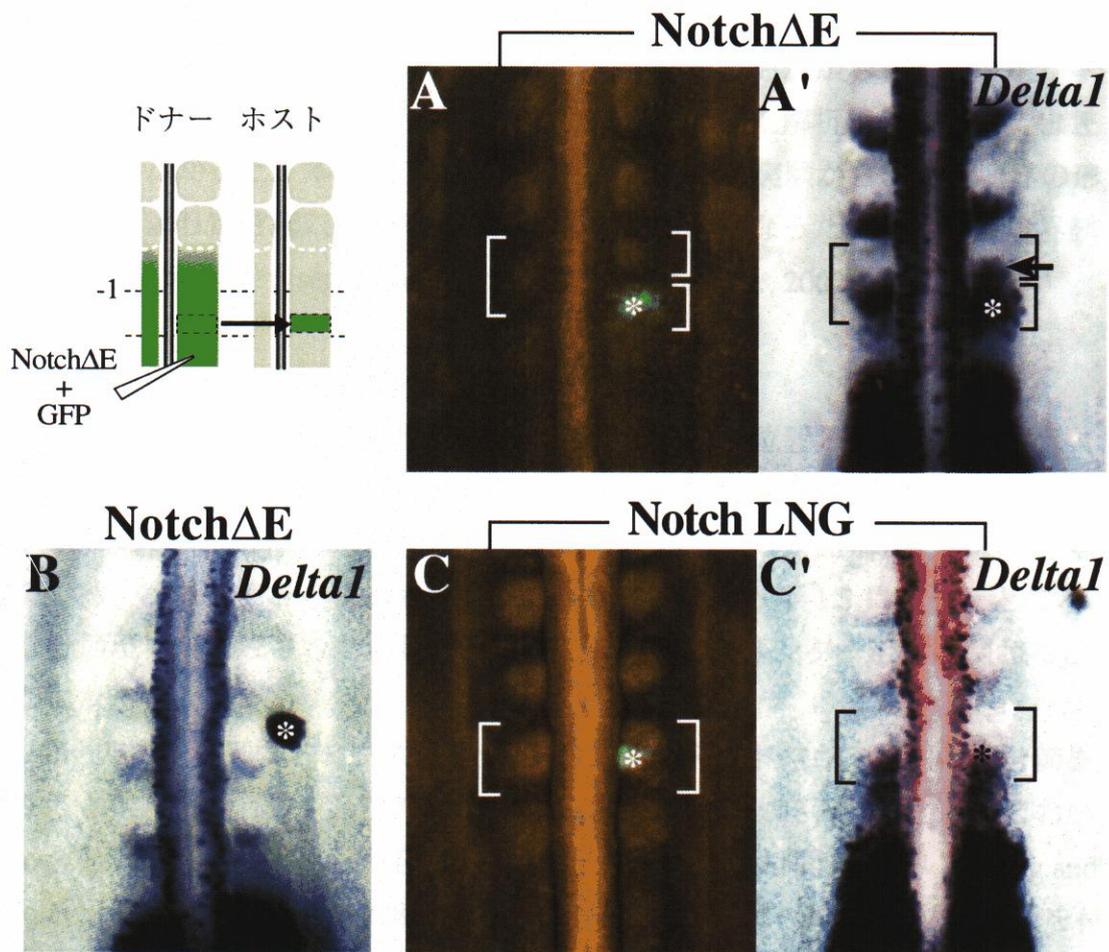


図10 小体節の前後極性

(A, A') Notch ΔE 発現細胞により形成された 2 つの小体節のうち、前側の宿主組織からなる小体節は、その後側半分において異所的に *Delta1* を発現した (矢印)。(B) Notch ΔE を強制発現している移植片は、体節以外の領域に置かれても *Delta1* を強く発現し続ける (星印)。(C, C') Notch LNG の場合には、ホストの体節での *Delta1* の発現に影響はない。

考察

分節境界はレベル-1 からの誘導により形成される

次々と報告された分節異常を示す変異体の解析から、分節化現象の分子機構は近年になって急激に理解されるようになった。特に *L-fng* や *hairy/HES* に代表される、PSM での発現パターンを周期的に変化させる「分節時計」の機構は、多くの研究者をひきつけて止まない(Saga and Takeda, 2001; Dubrulle and Pourquie, 2002)。このように分節時計の制御機構の解明が爆発的に進んでいるにもかかわらず、体節が PSM からどのようにして切り離されるのかという視点に立った解析は、これまでほとんど行われていなかった。本研究で行ったレベル-1 の移植実験から、分節境界の形成が誘導現象によりひき起こされることが初めて明らかになった。この分節境界誘導活性を、「セグメンター(segmenter)」と名付けた(Sato et al., 2002)。

セグメンター活性は *L-fng*/Notch を介する

セグメンター活性をもつ細胞は、レベル-1 の後側に位置している。レベル-1 と一致した境界線をもつ *L-fng* の発現パターンは、まだ形態的な変化が見られないレベル-1 付近において、すでに「分子レベルでの」境界づくりが開始していることを物語っている。実際に *L-fng* を強制発現している境界をレベル-1.5 に作ったところ、異所的な分節境界が形成された。したがって *L-fng* はセグメンター活性に関わることが明らかになった。

L-fng のノックアウトマウスは Notch1 のノックアウトマウスと同様の分節異常を示すことから、ショウジョウバエのみならず、脊椎動物胚の分節化過程においても *L-fng* が Notch シグナル伝達経路の構成因子であることは間違いない(Zhang and Gridley, 1998; Evrard et al., 1998)。 *L-fng* は Notch のリガンド結合領域に糖鎖を付加することにより、リガンドとの親和性を制御する働きを持つことが報告されている(Bruckner et al., 2000; Moloney et al., 2000; Hicks et al., 2000)。これらの知見から、 *L-fng* が発現している部位において Notch シグナリングが活性化していることが予想された。 *L-fng* の発現境界をつくりだした場合と同様に、Notch 活性化境界をつくりだした場合にも異所的な分節境界が形成されたことから、セグメンター活性は Notch シグナリングを介することが明らかになった。以上の実験結果をもとに、次のような分節境界の形成モデルが考えられた(図 11A)。 *L-fng* はレベル-1 に隣接した後側の領域に発現する。そのため、Notch が活性化する部位はレベル-1 の後側に限局される。Notch 活性化細胞から前方に向かってセグメンターが産生され、分節境界が形成される。現在のところ、PSM 内のどこで Notch が活性化しているのかを示す直接的な証拠はない。しかし本研究により、レベル-1 の後側部位において Notch シグナリング

が活性化している可能性が示唆された。

L-fng の発現境界が Notch の活性化境界をつくりだす

ショウジョウバエの知見から、Notch シグナリングが活性化するのは L-fng の発現領域全体ではなく、発現境界部位であることが予想された。そこで L-fng 発現境界をレベル-1.5 に作り出した。その結果、L-fng オン-オフ境界（あるいは発現量の高低差がある境界）に形態的な分節境界が形成された。L-fng の発現境界は、その境界をはさんだ細胞間の Notch シグナリング活性化境界をつくりだすと推測できる。

エレクトロポレーション法により遺伝子を導入される細胞は、PSM 全体の約 50% 程度である。つまり L-fng を強制発現させられた細胞は、均一に PSM 内全体に分散している。しかし、PSM のそこかしこで L-fng 発現細胞と非発現細胞との間に形態的な境界が形成されたりはしなかった。移植操作によって L-fng 発現レベルの高い集団をつくりだした場合には、分節境界が形成されたことから、細胞集団としての Notch 活性化レベルの差が形態的な変化をもたらすために必要である可能性が考えられた。このように一細胞レベルと集団レベルとで異なる挙動を示す現象は、ゼブラフィッシュ胚を用いた移植実験により報告されている (Durbin et al., 2000)。最近、Dale らにより、L-fng を広範囲に強制発現された PSM が不規則な分節パターンを示すという報告がなされた (Dale et al., 2003)。そのような L-fng の効果は、本研究では観察されなかった。PSM へ遺伝子を導入する時期が本研究と同じかどうかは不明だが、エレクトロポレーション法を用いている点や発現ベクターなどは同じである。考え得る理由として、Dale らの方が、遺伝子導入効率が高い可能性が挙げられる。

L-fng は *c-hairy1* と同様に、1 回の分節周期の間に PSM の後側から前側に向かってあたかも波が伝わるかのように発現パターンを変化させたのち、レベル-1 の後側部位に限局する (Suetsugu et al., 2002)。発現パターンが変動している間の L-fng は、明瞭な発現境界をもたない。最近 L-fng の発現制御機構が詳細に解析され、発現パターンが変動している時と、レベル-1 で変動が停止する時とでは、その発現を制御するエンハンサー領域が異なることが明らかになった (Cole et al., 2002; Morales et al., 2002)。すなわち明瞭な境界線をもった L-fng の発現は、PSM 内でもレベル-1 に特異的な機構により制御されているようである。

レベル-1 における Notch シグナリングの役割

ショウジョウバエを用いた解析により、Notch 受容体を介する細胞間シグナル伝達機構の分子機序は詳細に解明されている。Notch シグナリングは、隣り合う細胞間のやりとりを中継することより互いの細胞運命を制御する機構として、さまざまな発生現象に関わっている。Notch シグナリングの構成因子は、脊椎動物においても保存

されている。そこで、ショウジョウバエの知見をもとに、「側方抑制型」と「翅成虫原基型」の2種類の Notch シグナリング作用モデルを考えた (図 11B)。

側方抑制とは、隣接する細胞同士が異なる細胞運命を獲得する際に働く分化抑制機構である。側方抑制の代表例として知られる神経前駆細胞の分化過程では、Notch と Delta は全ての細胞に発現している。このような状況下において、どの細胞で Notch が活性化するのは、隣り合う細胞間のリガンド発現量のわずかな差が決め手となるようである (Greenwald, 1998; Heitzler and Simpson, 1993)。Notch 活性化細胞では、リガンドの発現を抑制するフィードバック制御が働く。リガンド刺激を多く受け取った細胞では、リガンド発現量が減少していく。このフィードバック制御により、隣接している細胞間のリガンド発現量の差が増幅されるため、結果として Notch 活性化レベルの差が生まれる。このような知見から、ニワトリ胚の PSM においても *L-fng* の発現量の差をもとにして、Notch 活性化レベルの差が現れると予想された。側方抑制現象における Notch シグナリングの作用をレベル-1 に当てはめた場合、Notch 1 の活性化部位はレベル-1 の後側だけに限局する。レベル-1 の後側部位では、*HES7* が発現している。Hairy/HES ファミリーは、Notch 活性化により発現を誘導され、転写抑制因子として働くことが知られている。*HES7* ノックアウトマウスは分節異常を示すことから (Bessho et al., 2001)、レベル-1 の後側部位において *HES7* が Notch の下流因子として働いていると考えられる。反対にレベル-1 の前側部位では、*HES1* および *HES5* が発現しているが、これらのダブルノックアウトマウスは分節異常を示さず、レベル-1 の前側部位における機能は不明である (Ohtsuka et al., 1999)。

ショウジョウバエの翅成虫原基の背腹境界は、Notch シグナリングを介した相互作用により確立される。背腹境界をはさみ、その背側領域で発現している Notch は、腹側領域で発現している Delta からのシグナルのみを受け取る。一方、腹側領域で発現している Notch は、背側領域に発現している Serrate からのシグナルを受け取る。その結果、背腹境界部位に Notch 活性が限局され、将来の翅の辺縁部が決定する。つまり翅成虫原基における Notch は、背側と腹側とで結合できるリガンドが異なる。このようなりガンド選択性は、背側領域に特異的に発現している Fringe の働きによる。Fringe は Delta との相互作用を促進し、反対に Serrate との相互作用を抑制する。翅成虫原基における Notch シグナリングの作用をレベル-1 に当てはめた場合、次のようなモデルが考えられる。*L-fng* による糖鎖修飾を受けた Notch 1 は、Delta 1 のみと結合する。糖鎖修飾をうけていない Notch 1 は、他のリガンド (Delta 3 を候補に考えている) と結合する。レベル-1 の後側部位では Delta 1 により Notch 1 が活性化し、その結果 Delta 3 の発現が維持される。この Delta 3 はレベル-1 の前側部位の Notch 1 を活性化し、その結果 Delta 1 の発現が維持される。このフィードバックループにより、レベル-1 の両側にまたがって、Notch 活性レベルの高い状態が維持される。

Notch シグナリングはこれらのいずれかの機構により、レベル-1 をはさんで隣接している細胞群に、分節境界の前側になるものと後側になるものという異なるアイデンティティーを与える役割を果たしていると考えている。どちらのモデルの場合でも、フィードバック制御機構により、L-fng のわずかな発現量の差さえあれば Notch の活性化レベルの差が現れる。実際の正常な発生過程においても、L-fng の発現パターンは、個体によっては明瞭なオン-オフ境界線ではなく、発現の高低差がある境界線を示すことがある。すなわち分節境界は、L-fng 発現量の高低差がある境界線上に形成される。したがって、もともと L-fng を発現しているレベル-1.5 領域にも、L-fng 強制発現組織により異所境界を誘導できたのではないかと考えている。

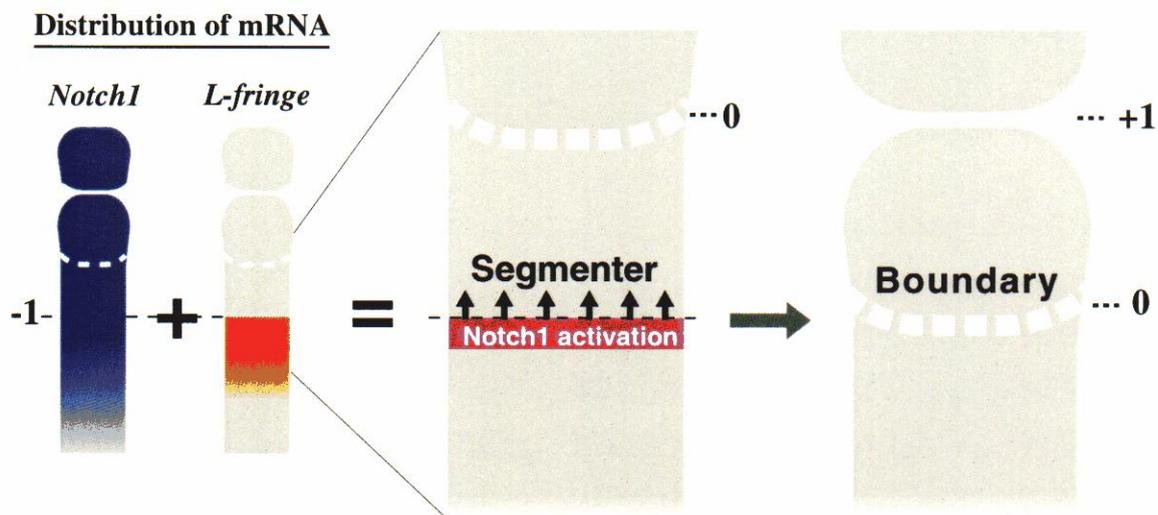
ギャップをつくり出す機構

Fringe ファミリーは、他の境界形成過程にも関わっていることが報告されている。Radical-fringe は、肢芽の背腹境界を決定する(Laufer et al., 1997; Rodriguez-Esteban et al., 1997)。またL-fringe は、視床の背腹境界の形成にも関わっている(Zeltser et al., 2001)。しかしながらこれらの境界は、体節に見られる分節境界のような明瞭な切れ目(ギャップ)をもたない。どうやら PSM には、ギャップをつくり出す特別な機構が働いているようである。具体的な機構としては、レベル-1 の前側部位と後側部位の細胞間の反発、あるいは接着性の変化などが考えられる。細胞間の反発による境界形成を支持する知見として、Eph-ephrin による細胞間反発機構が挙げられる。Eph は細胞膜上に存在する受容体型チロシンキナーゼである。Eph 受容体は細胞膜型リガンドの ephrin と相互作用することにより、さまざまな発生現象における細胞間反発現象をひき起こすことが知られている(Holder and Klein, 1999)。したがって分節境界をつくり出す際にも、レベル-1 の前側と後側の細胞間において反発現象が起こっている可能性が考えられる。実際に Eph ファミリーの一つ EphA4 は、レベル-1 の後側部位で発現を開始する(Hirano et al., 1998; Suetsugu et al., 2002)。ここでの EphA4 の発現は Notch シグナリングに依存することが、報告されている(Barrantes et al., 1999)。一方、細胞接着機構の関与を示唆する知見も報告されている。Paraxial Protocadherin (PAPC) は、同種親和性(ホモフィリック)結合により、細胞接着装置として働く(Obata et al., 1995)。PAPC はレベル0(形成中の分節境界)の後側部位に特異的に発現する(Yamamoto et al., 2000)。PAPC は、分節境界の前側と後側の細胞が混ざりあうのを防ぎ、分節境界を維持する働きをもつと考えられている。この PAPC の発現もまた、Notch シグナリングにより制御されていることが報告されている(Kim et al., 2000)。セグメンター活性は、これらの細胞間反発因子および接着因子の働きによる可能性が高い。

PSM の後方領域は「未熟」と考えられている。実際に Notch 活性化細胞による分節境界の誘導は、前方の「成熟した」PSM のみにひき起こされ、後方の「未

熟な」PSMには起こらなかった(図9)。この結果は、セグメンターが作用するにはNotchシグナリングだけでなく、誘導を受ける側の応答能も重要であることを示している。この応答能に関わる分子として、EphA4のリガンドの一つである*ephrinB2*が関わっている可能性が高い。実際に*ephrinB2*が、PSMの前方領域でのみ発現することを確認している(補足図参照)。

A



B

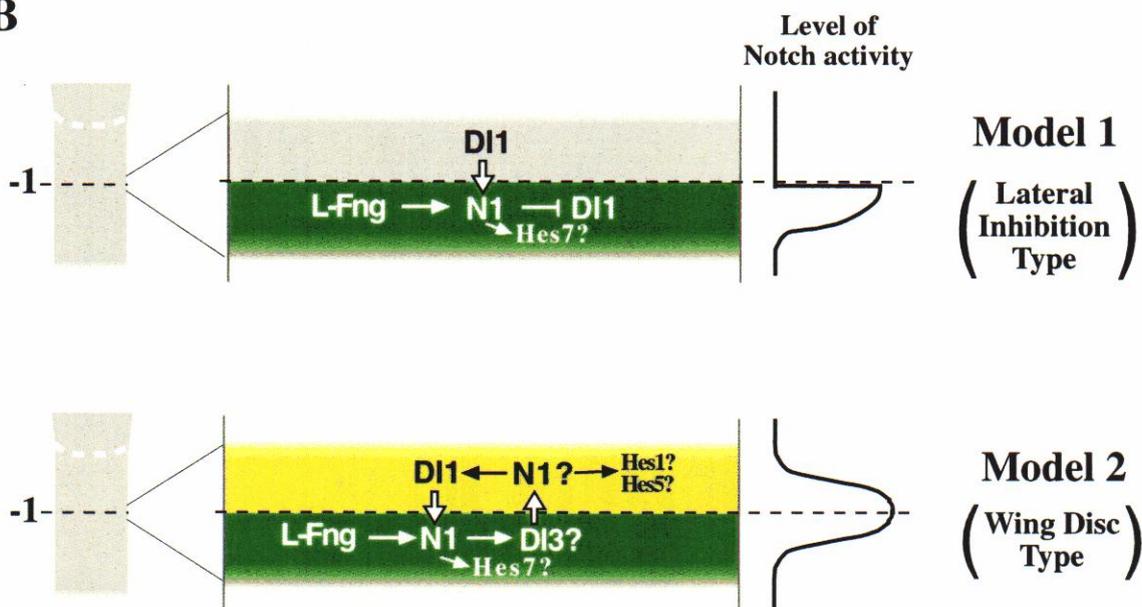


図 11 境界形成過程における Notch シグナリングの作用 (モデル)

(A) レベル -1 の後側部位から前側に向かって境界誘導シグナルが作用する (セグメンター、本文参照)。 *L-fringe* はレベル 0 の後側部位でも発現するが、このモデル図ではレベル -1 の後側部位での発現を強調するために省略している。(B) ショウジョウバエの知見をもとにした、レベル -1 での Notch シグナリングの作用モデル (本文参照)。

第二部

腹側から背側に向かって作用する境界誘導現象

序論

脊椎動物の初期胚の体幹部を構成している組織は、ほとんどが薄いシート状の構造をしている。その中で唯一 PSM のみが、無数の間充織細胞からなる 3 次元構造をとる (図 1B)。間充織細胞が立体的に配置している PSM 内に分節境界が作り出されるまでには、どのような制御が働いているのだろうか? 本研究ではこの問いに答える上で手がかりとなる細胞間相互作用を見いだした。

第一部で述べたように、分節境界の形成過程には Notch シグナリングを介して働く境界誘導活性 (セグメンター) が関わっている。セグメンター活性をもつ部位の移植により、本来は分節境界を形成しない領域内に異所的な分節境界が形成された。この結果は、分節境界を形成しない領域の細胞にもセグメンターに対する感受性があることを示している。すなわち分節境界が形成される位置は、セグメンター活性が現れる位置に従う。正常な分節化過程では、予定分節境界 (レベル-1) の後側のみセグメンターが現れる。レベル-1 に位置する細胞は、どのようにしてセグメンター活性を獲得するのだろうか? この疑問に答えるため行った移植操作から、腹側から背側へ向かって伝わる分節化誘導シグナルが存在することを見いだした。この腹側から背側へ作用する境界誘導シグナルについて、詳細に解析した。

結果

背腹軸に沿って引き起こされる誘導現象

レベル-1 の細胞がどのようにして境界誘導能を獲得するのかを知るため、本来は分節しない領域をレベル-1 の環境下へ移し、影響を調べた。もしレベル-1 の周囲の環境が分節化誘導能を与えているとしたら、本来は分節しないはずの移植片内に分節境界が形成されることが期待された。ドナー胚の分節しない領域を DiI および DiO で標識し、宿主胚のレベル-1 領域へ移植した (図 12A)。その結果、移植片内に分節境界が形成された (30 個体、図 12B 矢印)。移植片内に形成された分節境界の位置は、宿主胚の境界と同じ位置であった。縦断切片を作製し、QCPN 抗体染色により移植片の位置を調べたところ、本来は分節境界を形成しないはずの移植片は、確かに明瞭な分節境界を形成していた (図 12C 矢印)。この時、移植片の腹側部分には宿主胚の組織が存在していた (矢頭)。PSM の腹側部分はからだの深部に位置しており見えにくいいため、操作を施しにくい。そのため、腹側領域の組織を完全に除去できない場合もある。分節境界が形成された移植片の腹側には、必ずホストの境界部位の組織が存在していた。したがって、移植片に分節化をひき起こしたのは、完全に除去されないまま残っていた宿主胚のレベル-1 組織である可能性が考えら

れた。この可能性を検証するため、ホスト胚のレベル-1 付近の組織をガラスキャピラリーで吸引し、完全に除去した後、分節しない領域由来の組織片を移植した (図 12E)。この場合には、移植片内に分節境界は形成されなかった (10 個体、図 12 F, G)。つまり背側の移植片に分節境界を形成させたのは、腹側のホスト胚レベル-1 組織である可能性が高い。すなわちレベル-1 の腹側部位には、背側に分節化をひき起こす誘導能があると考えられた。また移植片に分節境界が形成されたものの中には、境界の後側のみホスト組織が存在している場合があった (3 個体、図 12D)。したがって、この誘導現象はレベル-1 の後側部位さえあればひき起こされると予想した。

レベル-1 の腹側部位は背側へ分節境界を誘導する

レベル-1 の腹側部位には、背側へ分節境界を誘導する活性があることを直接的に検証するため、ドナー胚レベル-1 の腹側部位のみを取り出し、ホスト胚レベル-1.5 の腹側へ移植した。ドナー組織は、PSM から短冊状に切り出した後にさらに背側部位と腹側部位に切り分けた。PSM を輪切りにした断面は、背側と腹側が容易に判別できるような特徴的な形を示すので、その特徴をもとにして背側部位と腹側部位を正確に切り分けることが可能である。この移植操作の結果、移植片の背側に位置するホスト組織に異所的な分節境界が形成された (3 個体、図 13A 矢印)。分節境界を形成しない領域の腹側部位を移植した場合には、このような異所境界は形成されなかった (5 個体、図 13B)。したがって、レベル-1 の腹側部位には、背側へ分節境界の形成を誘導する能力があることが証明された。さらに、異所境界の後側部位のみに移植片が存在していたことから (2/3 個体、図 13A 矢頭)、この誘導現象はレベル-1 後側部位の腹側細胞さえあればひき起こされることが明らかになった。

レベル-1 の背側部位も背側への分節誘導能をもつ

レベル-1 の後側部位がその前側へ分節境界を誘導する活性 (セグメンター) をもつことは、第一部で述べたとおりである。さらに図 12 および 13 で示した結果から、レベル-1 の腹側部位にはその背側に向かって作用する境界誘導シグナルが存在する可能性が示唆された。この腹側から背側に向かって伝わる誘導シグナルが、境界形成過程にどのように関わっているのかを知るため、腹側と背側の間を遮断し、影響を調べた。もし腹側からの作用が分節化過程に必須の役割を果たしているならば、背側部位には分節境界が形成されないはずである。銀箔をレベル-1 から-2 領域の腹側と背側の間に入し、両者を遮断した結果、分節境界は正常に形成された (14 個体、図 14)。この結果は、分節境界の形成には腹側部位からの作用が必須でないことを示している。

そこで、次に背側部位にも腹側と同様の誘導能があるのかを検証した。ドナー胚レベル-1の背側部位のみを取り出し、ホスト胚の分節境界を形成しない領域の腹側へ移植した。その結果、移植片の背側のホスト組織に異所的な分節境界が形成された(3個体、図15A 矢印)。この結果は、背側部位にも背側へ向かって分節境界を形成させる誘導能があることを示す。つまり腹側部位のみが背腹軸に沿って境界を誘導する特別な活性をもっているわけではないことが判明した。すなわちレベル-1の組織は、もとの背腹レベルに依存せず背側に向かって境界を誘導する能力がある。

分節誘導シグナルは背側から腹側には作用しない

この分節誘導シグナルは背側から腹側へも作用するのだろうか？この疑問に答えるため、レベル-1由来の組織片を背側へ移植し、その腹側に異所的な分節境界を誘導できるか調べた。ドナー胚レベル-1の腹側あるいは背側を取り出し、それぞれをホスト胚レベル-1.5の背側へ移植した。その結果、移植片の前側には異所的な分節境界が形成されたが、腹側には形成されなかった(3個体、図16A)。すなわち、背腹軸に沿って境界を誘導するシグナルは、腹側から背側には作用するが、背側から腹側へは作用しないという性質をもつことがわかった。

PSMの中軸側 (medial)と側方側 (lateral)とを切り離すと中軸側のみが分節化し、側方側は分節しないことから、分節化には中軸側から側方側への作用が必要であるという報告がある(Freitas et al., 2001)。そこで次からだの中軸-側方軸に沿って境界誘導が起こるか調べた。ドナー胚レベル-1から中軸側あるいは側方側を取り出し、それぞれをホスト胚の分節しない領域へ移植した。この移植操作では、中軸側から取り出した組織片はホスト胚の中軸側へ、側方側から取り出した組織片はホスト胚の側方側へ移植している。これらの操作の結果、分節境界は移植片内のみ形成され、ホストの組織には何の影響も及ぼさなかった(図17A, B 矢印)。したがってFreitasらが報告した中軸から側方への作用は、分節境界の形成ではなく、もっと早い段階(例えばL-fngの発現を中軸-側方軸に沿って同調させる機構など)に関わっていると考えられる。この操作から、分節境界の形成をひき起こす誘導シグナルは、中軸-側方軸には伝わらないことがわかった。

体節の前後極性は最構成される

腹側からの誘導により分節境界を形成された移植片は、2つの体節にまたがっている(図12A-D)。形態的には正常な体節と同じように見えるが、この移植片は本来、一個の体節を形成するはずである。そこで移植片を含む体節が、見た目どおりの正常な前後極性を確立しているのかを調べた。各体節の後部マーカである*Delta1*の発現を調べた結果、移植片を含む体節はそれぞれ正常な発現パターンを示した(2個

体、図 18B)。さらに各体節の前部に形成される背側神経節 (DRG: dorsal root ganglion) の位置を組織切片により確認したところ、正常な位置に形成されていた (17 個体、図 18C)。背側神経節は神経管から移動してくるホスト胚の神経堤細胞に由来するため、QCPN では染まらない (Le Douarin and Kalcheim, 1999)。これらの結果から、腹側からの作用により分節化を誘導された組織は、正常な体節の一部として振る舞うことがわかった。

図 18A の操作において移植したドナー胚組織片の後部は、本来、体節の後部になるはずである (緑丸印)。しかしレベル-1 に移植され分節誘導を受けた結果、体節の後側になるはずの位置に背側神経節が形成された (図 18C 緑丸印)。つまりこの移植片は、本来の運命とは異なる前後極性を獲得した。次にレベル-1 をレベル-1.5 領域へ移植することにより形成された小体節 (図 3A) についても、前後極性が確立されているか調べた。その結果、2 つの小体節のそれぞれの後側部分において、*Delta1* の発現が観察された (6 個体、図 18E)。さらに背側神経節も、2 つの小体節のそれぞれの前側に形成されていた (9 個体、図 18F)。つまり、本来は体節の後部になるはずの位置 (図 18D 赤丸印) に背側神経節が形成された (図 18F 赤丸印)。すなわち分節境界の形成に伴い、体節の前後極性が再構成された。第一部で述べたように、Notch 活性化により誘導された小体節も正常な前後極性をもっていた。つまり各体節の前後極性は、分節境界の形成に附随して確立される可能性が高い (図 10)。上記で示した実験結果は、この可能性を強く支持している。

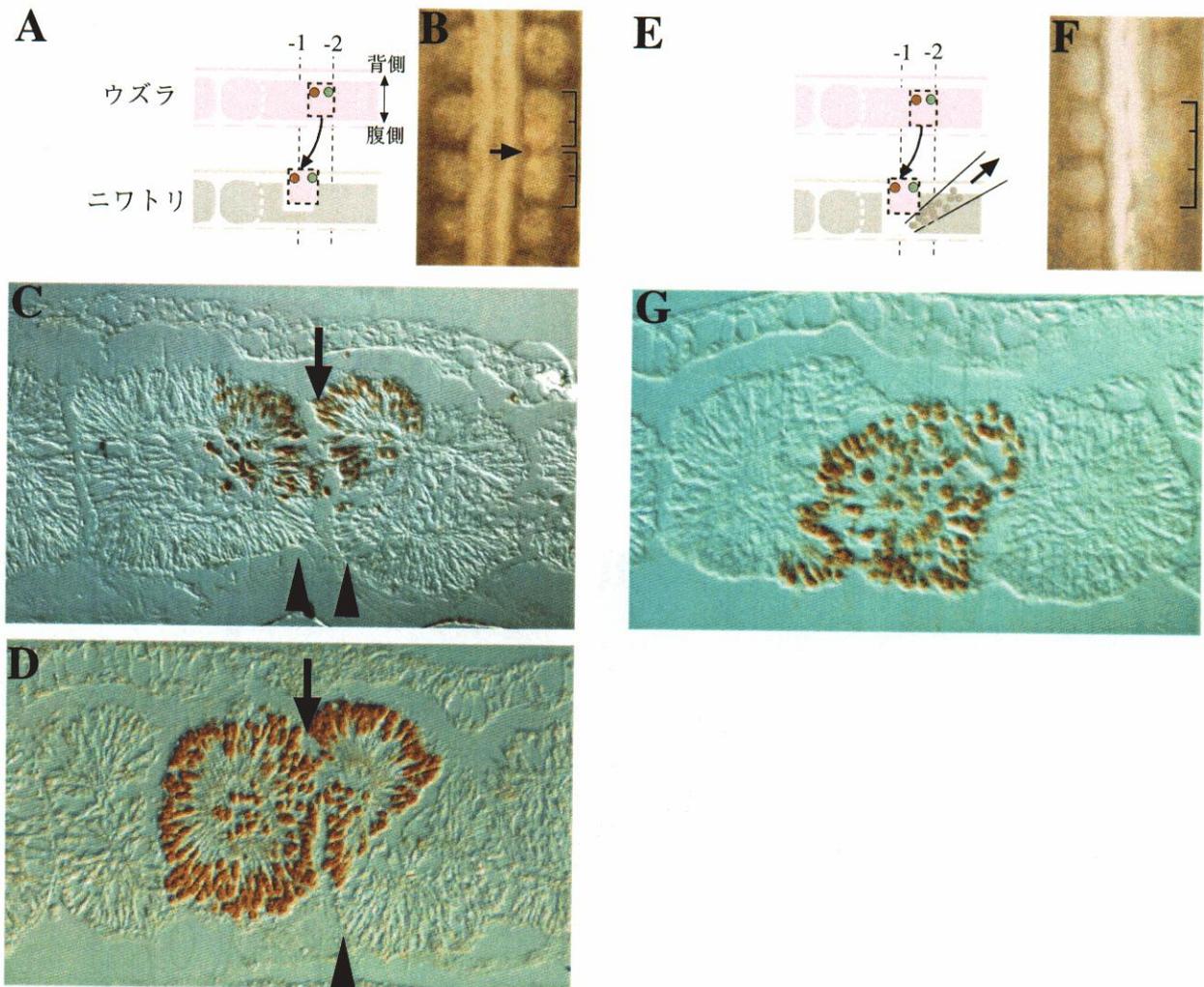


図 12 腹側からの作用により分節境界が誘導された

(A) 移植操作をからだの側方からみた模式図。ドナー胚（ウズラ）の本来は分節境界を形成しない領域を DiI および DiO で標識し、ホスト胚（ニワトリ）のレベル -1 領域へ移植した。この時、レベル -1 の後側部位（セグメンター活性をもつ）を含まないように注意した。(B) 赤色と緑色に標識された移植片は、ホスト胚と同じ位置で分節境界を形成した（矢印）。(C) この移植片は明瞭な分節境界を形成していた（矢印）。移植片の腹側にはホスト胚の組織が存在している（矢頭）。(D) 移植片が分節境界を形成したものには、境界の後側のみにホスト胚が存在している場合があった（矢頭）。(E) ホスト胚のレベル -1 付近の組織をガラスキャピラリーで吸引して完全に除去した後に、移植操作を行った。(F) この場合には移植片はひとつつながりのままであった。(G) 確かに移植片の腹側にホスト胚の体節組織は存在していない。(A, F) 背側からみたホスト胚。上が頭側。(C, D, G) 移植操作を施された部位の縦断切片。QCPN 抗体染色によりウズラ細胞を検出した。左が頭側、上が背側。すべて移植後約 5 時間発生させた胚。

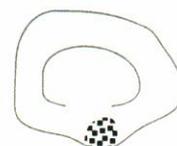
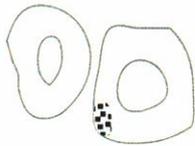
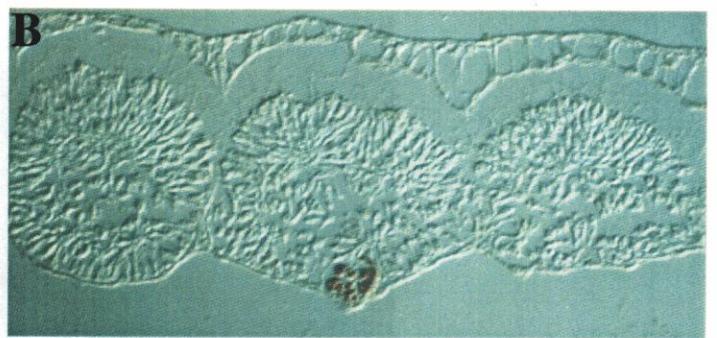
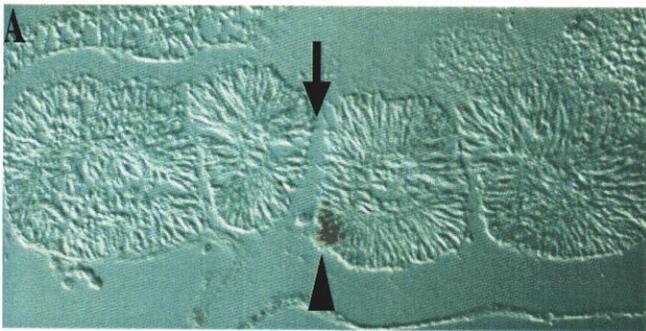
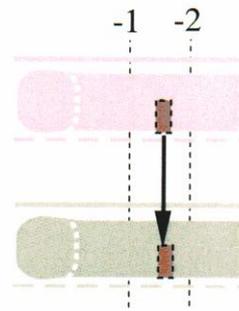
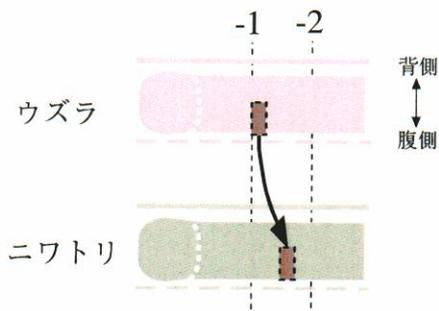


図13 腹側部位は背側へ分節境界を誘導する

(A) ドナー胚レベル -1 の腹側部位をレベル -1.5 の腹側領域へ移植されたホスト胚（約 5 時間経過したもの）の縦断切片。ドナー細胞は腹側に存在している（矢頭）。その背側のホスト組織に異所的な分節境界が形成された（矢印）。(B) レベル -1.5 の腹側部位を移植した場合には、影響は見られなかった。すべて QCPN 抗体染色。左が頭側、上が背側。写真の下に、移植片の位置およびホスト胚体節の形態を模式的に示した。

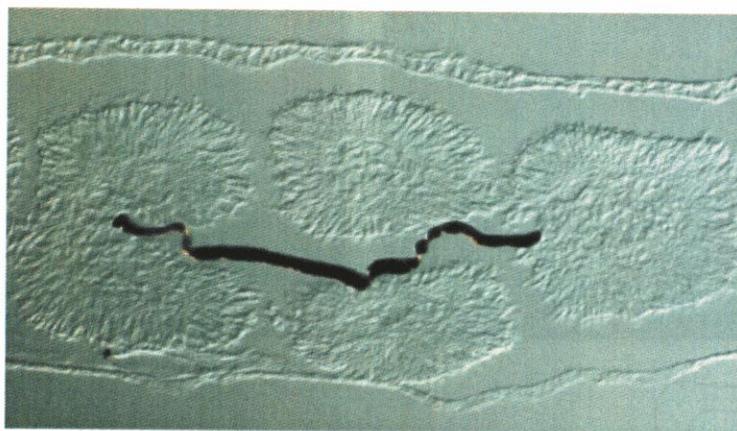
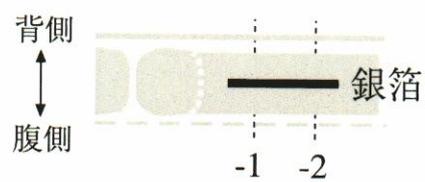


図 14 腹側と背側とを遮断しても分節境界は形成される
 レベル -1 から -2 領域の腹側と背側の上に銀箔（厚さ約 $5\mu\text{m}$ ）を挿入後、約 6 時間発生させた胚の縦断切片。分節境界は正常に形成されている。中央の体節は、銀箔に接している部分が上皮化している。これは銀箔による影響と思われる。

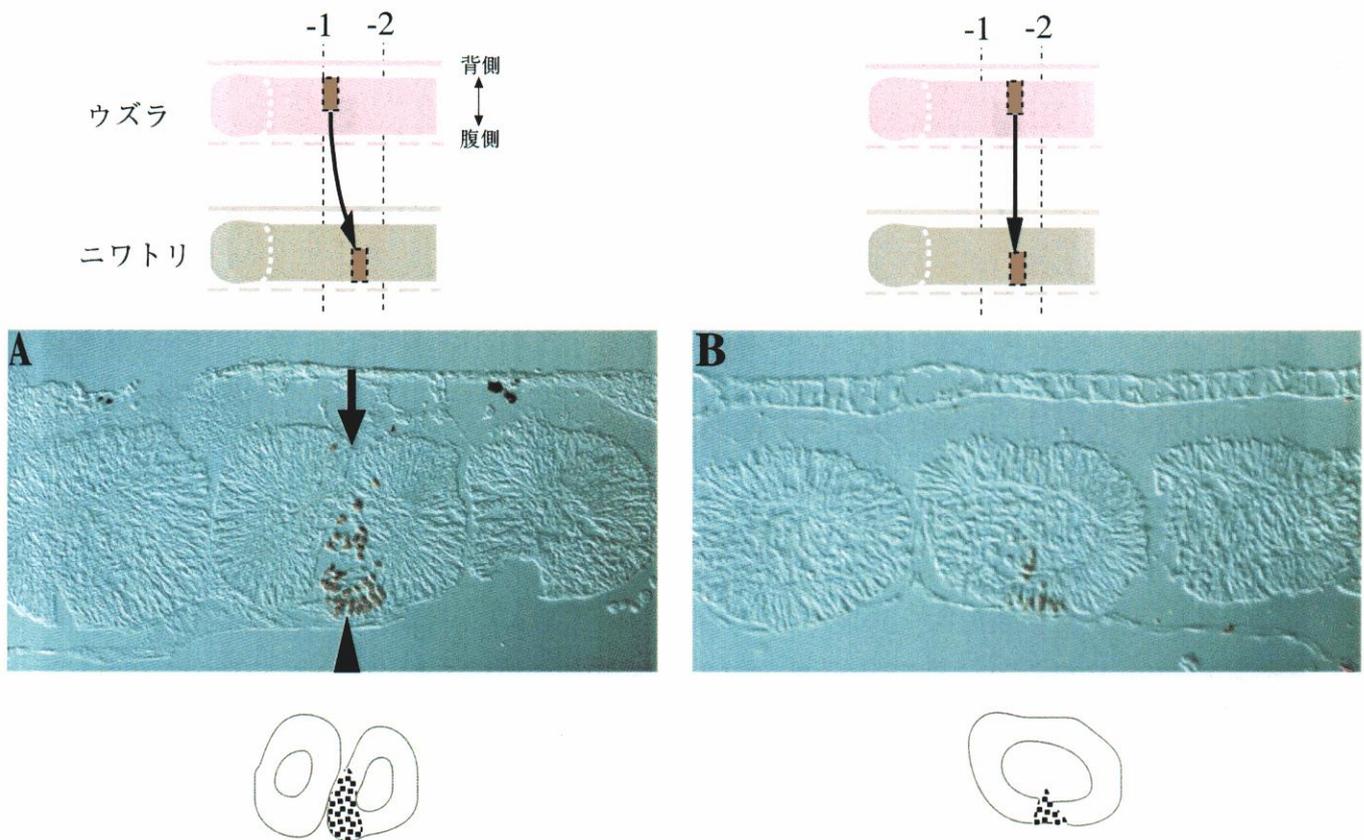


図15 背側部位も背側への境界誘導能を持つ

(A) ドナー胚レベル -1 の背側部位をレベル -1.5 の腹側領域へ移植されたホスト胚（約 5 時間発生させたもの）の縦断切片。ドナー細胞（矢頭）の背側に位置しているホスト組織に異所的な分節境界が形成された（矢印）。(B) レベル -1.5 の背側部位をドナーに用いた場合、影響は見られなかった。

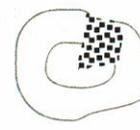
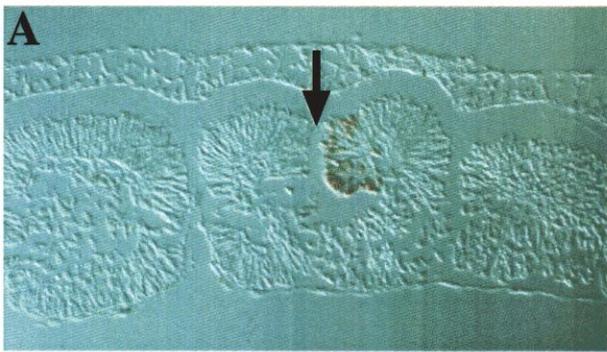
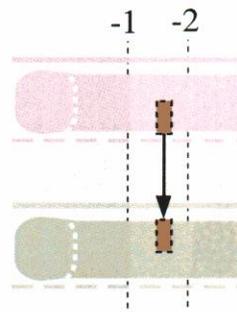
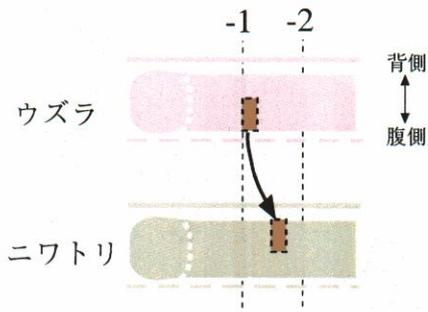


図 16 境界誘導シグナルは背側から腹側へは伝わらない

(A) ドナー胚レベル -1 の腹側部位をレベル -1.5 の背側へ移植されたホスト胚 (約 5 時間経過したもの) の縦断切片。移植片の前側のみに異所的な分節境界が形成された (矢印)。しかしその腹側のホスト胚には分節境界は形成されなかった。(B) レベル -1.5 の腹側部位を移植した場合、影響はない。

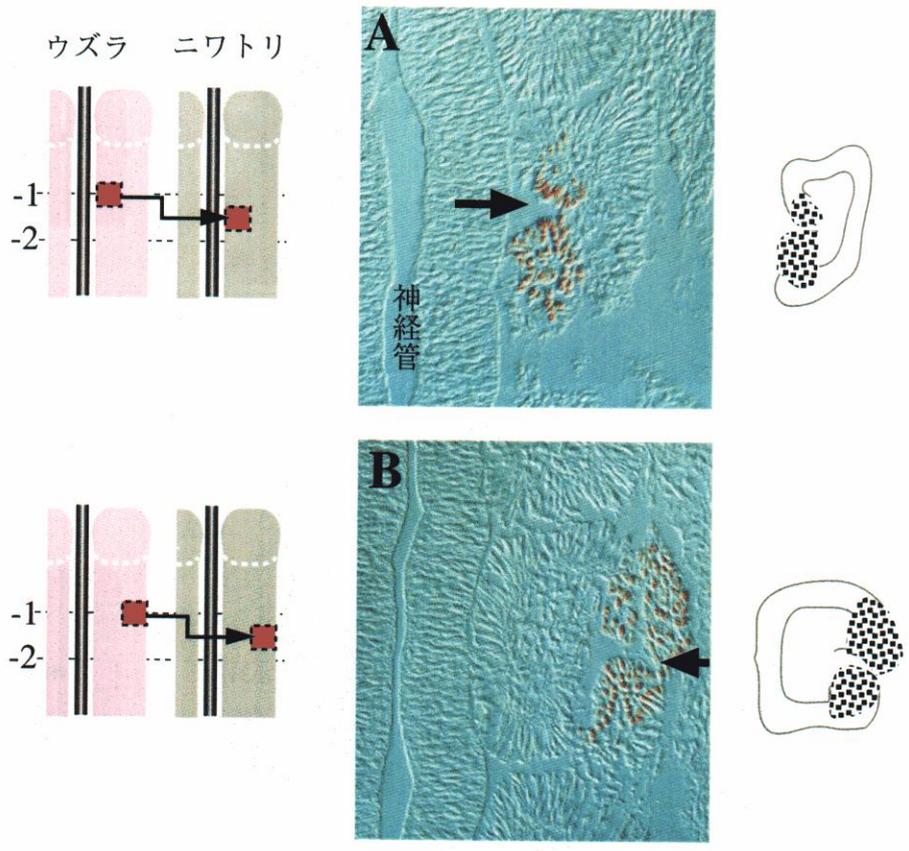


図 17 境界誘導シグナルは中軸と側方軸に沿って伝わらない

(A) ドナー胚レベル -1 の中軸側をレベル -1.5 の中軸側へ移植されたホスト胚の水平切片。上が頭側、左が中軸（神経管）側。分節境界は移植片内には形成された（矢印）が、ホスト胚には形成されなかった（5 個体）。(B) 側方側についても同様の移植操作を行ったが、ホスト胚に異所的な分節境界は形成されなかった（3 個体）。

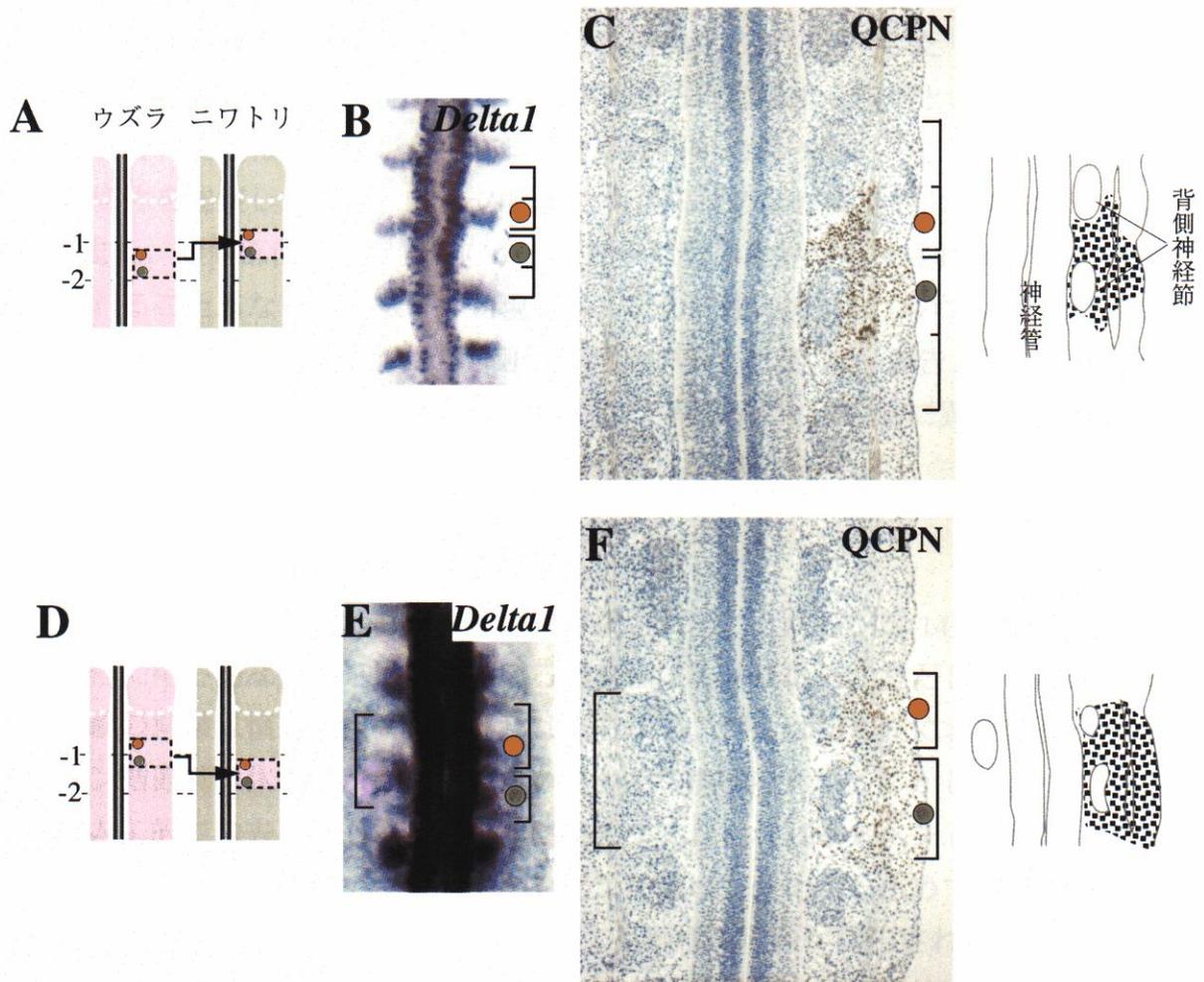


図 18 境界形成過程を経て再構築された各体節の前後極性

(A, B, C) 背側からの誘導により分節境界を形成した移植片 (図 12A と同じ移植操作) を含む体節の前後極性。各体節の後部マーカーである *Delta1* は、実際の体節の形に従って、正常な発現パターンを示した (B)。さらに背側神経節も正常な位置に形成された (C)。(D, E, F) 図 3A と同様の操作により形成された 2 つの小体節の前後極性。*Delta1* は各小体節の後部で発現した (E)。背側神経節もそれぞれの体節にひとつずつ形成された (F)。(B, E) 移植操作後約 5 時間発生させた胚を背側から見たもの。(C, F) 移植操作後約 48 時間発生させた胚の水平切片。QCPN 抗体染色後、ヘマトキシリン染色を行った。すべて上が頭側。

考察

腹側から背側に向かって作用する境界誘導シグナルがある

レベル-1の後側部位には、その前側に分節境界を形成させる誘導能（セグメンター）があることは、第一部で述べた。そのさらに腹側部位さえ存在していれば分節境界が誘導できることが、第二部で行った移植操作により判明した（図12, 13）。すなわち、レベル-1では、前側に向かって作用する細胞間相互作用と、背側に向かって作用する細胞間相互作用が存在することが明らかになった。

組織切片を観察した限り、PSMの腹側と背側部位の間に形態的な違いはない（図1A）。また、腹側部位から背側に向かって順々に分節境界が形成されるという現象が観察されることもない。遺伝子の発現レベルでの背腹の違いについては、両生類胚のPSMにおいて*hairy2a*の発現が背側から開始することが、唯一報告されている(Davis et al., 2001)。ただし、両生類の分節化過程は他の脊椎動物とは大幅に異なるため(Keller, 2000)、本研究で見いだした誘導現象との関わりは不明である。

誘導シグナルが作用する方向と細胞極性との関わり

腹側と背側とを遮断しても分節境界が形成されたことから（図14）、腹側部位が分節化過程に中心的な役割を果たしている可能性は非常に低い。ただし、このような遮断実験の結果は慎重に判断しなければならない。例えば初期胚において見られるヘンゼン結節は、体軸の形成過程において必須の機能をもつ。しかしこのヘンゼン結節を人工的に除去しても、胚は正常に発生する。これは本来ヘンゼン結節にはならないはずの周囲の細胞が、新たにヘンゼン結節へと分化するためである(Psychoyos and Stern, 1996)。また、神経堤細胞についても同様の現象が報告されている。神経堤細胞は移動先が決まっている。移動前の一部の神経堤細胞を人工的に除去すると、その周囲の細胞が代わりに目的とする場所へと移動する(Kulesa et al., 2000)。これらの知見は、発生中の胚の細胞運命が再構成し得ることを示している。このような知見を踏まえると、銀箔を挿入されたことにより遮断されたそれぞれの組織内に、新たな背腹軸が再構築される可能性も考えられた。しかし、背側部位のみを移植した場合にも背側への異所的な境界誘導が起こったことから（図15）、背側と腹側とで分節誘導能の違いはないと考えられる。したがってPSM内の絶対的な腹側-背側の位置は、この誘導現象にとって重要ではないと結論づけた。

この境界誘導シグナルは背側に向かって作用し、腹側には作用しなかったことから（図16）、PSM細胞間の相対的な腹側-背側の位置関係が重要であるようだ。具体的な可能性として、誘導能を持った細胞は背側にしか誘導シグナルを送れない。あるいは誘導を受ける側の細胞は、腹側からやってくる誘導シグナルにしか反応でき

ない、などが挙げられる。つまり PSM 細胞ひとつひとつが背腹極性を持っており、それが誘導作用に方向性を与えていると予想した。またセグメンターも前側方向のみに作用し、後側方向には働かなかったことから (図 8)、PSM 内の個々の細胞は背腹軸および前後軸に沿った極性を持つ可能性が高い。このように各細胞が一定の向きに揃った極性を確立する現象 (平面内細胞極性) は、主にショウジョウバエを用いた研究により解明されつつある (Usui et al., 1999)。特に Wnt シグナリングの関わりは詳細に調べられている (Park et al., 1994)。ニワトリ胚の PSM においても、*Wnt-11* およびそのリガンドの *Frizzled 2* がレベル-1 付近で発現している (Cauthen et al., 2001; Tonegawa et al., 投稿中)。また、Wnt シグナリング構成因子の一つ、*Dishevelled 2* のノックアウトマウスは分節異常を示すことが最近報告された (Hamblet et al., 2002)。これらはまだ傍証に過ぎないが、Wnt シグナリングが PSM 細胞の背腹極性を揃える役割を担っているかもしれないという予想を支持している。さらにこの背腹極性には、PSM の背側に存在する表皮外胚葉や腹側に存在する動脈および内胚葉との相互作用が関わっている可能性も大いに考えられる。

腹側から背側へ作用する境界誘導シグナルの役割

本研究により得られた結果は、PSM の 3 次元構造内に分節境界が作り出されるまでには、様々な細胞間相互作用が働いていることを示している。正常な発生過程において、腹側から背側に向かって作用する誘導シグナルが分節境界の形成にどのように関わっているのか、次のようなモデルを考えた (図 19)。①まずレベル-1 の後側部位のいくつかの細胞が何らかの機構により境界誘導能を獲得する (赤色の細胞)。②そして自身の背側に位置する細胞 (分節境界の前側になるのか、それとも後側になるのか、どっちつかずの状態にある) に、自分と同じ性質を持つよう働きかける。③その結果レベル-1 の背腹軸に沿った一直線上に境界誘導能をもつ細胞が配置され、④セグメンターの働きにより分節境界が形成される。このモデルでは、境界誘導能がレベル-1 付近の細胞で比較的ランダムに獲得されると想定している。この予想を裏付ける証拠は、現在までのところない。しかしながら、PSM の 3 次元構造内にギャップをつくり出すためには、3 次元レベルで細胞の挙動が揃う必要がある。このモデルをわかりやすく例えるならば、100 人全員が同時に指令を受けるのではなく、100 人いる中の 10 人がまず指令を受け取り、周りの人がそれに従うという方法で統制を取るしくみである。

個々の体節の前後極性の確立は分節境界の形成に附随して起こる

それぞれの体節がもつ前後極性は、PSM 内であらかじめ決定されていると長年考えられてきた (Keynes and Stern, 1984; Palmeirim et al., 1998)。この解釈は、「Clock and

Wave Front」モデルにもっともマッチするため、現在も多くの分節研究者に受け入れられている。本研究において異所分節により形成された小体節は、正常な前後極性を獲得していた（図 10、図 18）。つまり、本来の発生運命とは異なる運命が再構築された。この結果は、これまでの解釈とは異なる可能性を示唆している。すなわち個々の体節の前後極性は、分節境界の形成に附随して確立される。最近、この新たな解釈を支持する実験事実が、本研究とは異なるアプローチにより報告された(Ozaki, 2001)。各体節の前後極性が確立される過程は、bHLH 型転写因子 Mesp2 と Notch シグナリングの協調的な働きにより制御されていることが知られているが(Takahashi et al., 2000; Nomura-Kitabayashi et al., 2002)、Mesp2 と本研究で見い出した誘導シグナルとの関わりは、現在のところ不明である。

おわりに

胚発生過程において、組織間の相互作用は非常に重要である。両生類胚やニワトリ胚を用いた移植操作により明らかにされてきた様々な組織間相互作用は、発生生物学において重要な概念のひとつである「誘導」という言葉を生み出した。この言葉は、「本来そこにあるはずのないものをつくり出す」現象を意味している。このような誘導現象は組織間だけでなく、細胞間でも起こり得る。本研究では、PSM の細胞が PSM の細胞に作用し、本来そこにできるはずのない分節境界を形成させる現象を解析した。この誘導現象は、PSM 内に明瞭な分節境界が構築されるまでには、多彩な細胞間相互作用機構が働いていることを物語っている。これらの誘導現象を糸口として、今後、分節境界が形成されるしくみを 3 次元的に理解できることを期待している。

本研究を通して、生き物のからだがつくり出されるまでには、われわれの測り知れない制御が働いていることをあらためて認識した。特に第二部で見いだした腹側から背側へと作用する誘導現象を、分子レベルで説明するヒントはほとんどない。したがってこの分子機構を理解するまでには、さらなる時間を費やすことになるだろう。しかしながら、ニワトリ胚の移植操作により得られたこれらの知見を大切に、遺伝子进行操作する解析からだけではわからない生き物のかたちづくりの謎を今後も解明していきたい。

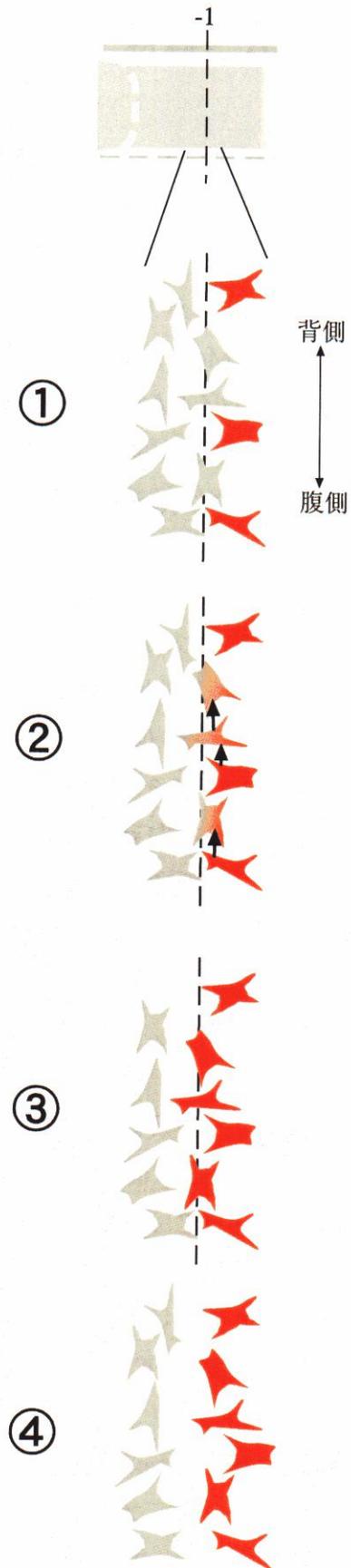


図 19 腹側から背側へ伝わる境界誘導シグナルの作用モデル (本文参照)

材料と方法

ニワトリ胚の顕微操作

ニワトリ有精卵（城山鶏園）およびウズラ有精卵（東海有機）を 38.5℃ でインキュベートし、体節数 16 から 20 の胚（ニワトリ胚は約 48 時間、ウズラ胚は約 36 時間インキュベーション）を得た。インキュベートしたニワトリ有精卵の殻に小窓を開け、胚を可視化するために黒インクを Hank's 液（140mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.6mM glucose, 0.34mM Na₂HPO₄, 10mM Hepes, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, pH7）におよそ 1 : 4 の割合で希釈し、キャピラリー（DIAMOND SCIENTIFIC 社、マイクロヘマトクリット用）を用いて胚の下に注入した。顕微操作後は殻に開けた小窓を梱包用テープでシールし、38.5℃ でインキュベートを続けた。

体節板細胞の蛍光標識には、DiI および DiO（ともに Molecular Probe 社）を用いた。各粉末をそれぞれジメチルホルムアミド（DMF）に溶解し（2.5mg/ml）、ガラスキャピラリー（ナリシゲ社）を用いて PSM に注入した。

ウズラニワトリ胚間の移植操作は次の方法で行った。ウズラ胚の移植したい部分を顕微バサミを用いておおまかに切り取り、1.25% パンクレアチン（GIBCO/BRL 社）/CMF（140mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.6mM glucose, 0.34mM Na₂HPO₄, 10mM Hepes pH7）溶液につけて室温で約 5 分間反応させた。反応液に等量の牛胎児血清を加えてパンクレアチン反応を停止させた後、Hank's 液で組織を数回洗い、タングステン針を用いて小片に切り出した。切り出した組織片を口径の大きなガラスキャピラリーで宿主のニワトリ胚に運び、タングステン針を用いてホスト胚 PSM 内に移植した。

組織学的解析

蛍光標識した胚を 4% パラホルムアルデヒド/PBS（2.73M NaCl, 53.7mM KCl, 166mM Na₂HPO₄, 35.3mM KH₂PO₄）で固定し（4℃、2 時間）、PBS で洗浄後、10%、20%、30% の順に sucrose/PBST 溶液で脱水し、Tissue-Tek O.C.T. Compound（SAKURA 社）に包埋した。クリオスタットで厚さ 8 μm の切片を作製した。切片をよく乾燥させた後、PBS で 2 回洗浄し、5U/ml に希釈したファロイジン（Alexa Fluor™ 647 phalloidin, Molecular Probe 社）/PBS 液に室温で 30 分間反応させた。反応後の切片を PBS で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス FV500）にて観察した。

ウズラの組織を移植された胚は、Carnoy's 液（60% エタノール、30% クロロホルム、10% 酢酸）で固定し、エタノール脱水、キシレン処理を行いパラフィンに包埋した。マイクロトームで厚さ 7 μm の切片にした。乾燥後の切片は脱パラフィン処理を行った後、2% スキムミルク/PBS でプレブロッキング、QCPN 抗体（ハイブリドーマの培養上清; DHSB）を反応させた（室温、2 時間）。PBS で洗浄後、2% スキムミルク/PBS

中へ 1/100 に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス Ig 抗体 (ウサギ) (DAKO 社) を反応させ (室温、90 分間)、PBS で洗浄後、発色を行った。発色液の組成は 0.08mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB)、0.004% H₂O₂/PBS。4 日目胚の切片は、QCPN 抗体染色後にマイヤーのヘマトキシリン液 (和光) に 30 秒間浸けた。

RNA プローブおよびホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

ジゴキシゲニン標識 RNA プローブは、以下の cDNA を鋳型に作製した。ニワトリ *L-fringe* cDNA 断片および *Notch1* cDNA 断片は、それぞれ Cliff Tabin 博士 (Laufer et al., 1997) と若松義雄博士 (Wakamatsu et al., 1999) から供与していただいた。*Delta1* cDNA は次のプライマーを用いて RT-PCR 法により 965bp の断片を得た。

5'TACTGCACTCACCACAAGCC3'、5'-TGATGGAGATGTCCTTCTCG3'。 *ephrinB2* cDNA 断片の単離に用いたプライマーは、5'-TGTGATATCAGACCAAGCAGATAGCTGTGC3'、5'ATGAAGCTTACTGGATGTCCATAGTCGCC3'。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションは利根川らの方法に従い、行った (Tonegawa et al., 1997)。胚を 4%PFA in PBS で 4°C、2 時間固定し、PBT (PBS, 0.1% Tween-20) で洗浄後、50%メタノール/PBT, 100%メタノールの順で処理した。メタノール処理後のサンプルを 6% H₂O₂/メタノールで漂泊 (室温、2 時間) し、75%, 50%, 25%メタノール/PBT の順で PBT に置換した。プローブの透過性を向上させるために、20 μg/ml proteinaseK/PBT で処理し (10 分間)、0.2% glutaraldehyde/4%PFA in PBS で再固定した。再固定液を PBT で十分に洗浄した後、サンプルをハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 5×SSC pH4.5, 1% SDS, 50 μg/ml tRNA, 50 μg/ml heparin) に移し、70°C でプレハイブリダイゼーションを行った。1 時間後、DIG 標識 RNA プローブを加えたハイブリダイゼーションバッファーに移し、70°C で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後は、50% formamide, 5×SSC, 1% SDS で洗浄し (70°C, 30 分間, 3 回)、未結合の RNA プローブを消化するため RNase 処理を行った。RNase バッファー (0.5M NaCl, 10mM Tris pH7.5, 0.1% Tween-20) で 5 分程度洗浄後、37°C、30 分間 100 μg/ml RnaseA を反応させた。次に 50% formamide, 2×SSC で洗浄し (65°C, 30 分間, 3 回)、抗体反応に移った。TBST (8mg/ml NaCl, 0.3mg/ml KCl, 2.5mM Tris pH7.6, 0.1% Tween-20) で 3 回洗浄後、10% 牛胎児血清/TBST でプレブロッキングを行い、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体

(Boehringer-Mannheim 社) を 1 晩反応させた。TBST で洗浄 (1 時間毎に 5 回)、NTMT (100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween-20) で 3 回洗浄後、発色基質を NTMT に加え、暗所で発色させた。発色液の組成は 0.45mg/ml nitroblue-tetrazolium chloride (NBT), 0.175mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphatase (BCIP)

(ともに Boehringer-Mannheim 社) /NTMT。発色後のサンプルは PBT で洗浄後、0.1% glutaraldehyde/ 4%PFA in PBS で後固定した。パラフィンに包埋し、厚さ 10 μ m の切片を作製した。

***in ovo* DNA エレクトロポレーション**

ニワトリ *L-fng-flag* (Clifford Tabin 博士から供与)、Notch Δ E-6myc および NotchLNG-6myc (Raphael Kopan 博士から供与) をそれぞれ発現ベクター pCAGGS (Niwa et al., 1991)へ挿入した。これらを pCAGGS-GFP (green fluorescence protein) と共に HH ステージ 7~8 の胚の予定 PSM 領域へエレクトロポレーション法により導入した。ニワトリ胚へのエレクトロポレーションは、船橋、百瀬らによって報告された方法 (Funahashi et al., 1999; Momose et al., 1999; Yasuda et al., 2000) に従い、行った。PSM 内へ効率よくプラスミドを導入するために、以下に示す改良を加えた。プラスミド溶液は 5 μ g/ μ l の濃度に調整した。また、このプラスミド溶液を着色するために添加するメチルグリーン (ナカライ) の濃度を 2% にした。プラスミド溶液をガラスキャピラリー (ナリシゲ社) を用いて原条 (primitive streak) の PSM 予定領域の上へのせ、プラス極 (プラチナ) を胚の下に、マイナス極 (タングステン) をプラスミド溶液の上に設置し、強さ 6V の電気パルスで、25 ミリ秒間、3 回与えた。

ウエスタンブロッティング

エレクトロポレーション法で用いたプラスミドを、Lipofectamine (GibcoBRL 社) により COS 細胞へ導入した。遺伝子導入後、48 時間経過した COS 細胞をサンプルバッファー (125mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 0.002% bromophenol blue) へ溶解し、 β -メルカプトエタノールを加え (最終濃度 5%)、95 $^{\circ}$ C で 2 分間処理した。8% SDS ゲルにて電気泳動後、ニトロセルロースフィルター (PROTORAN NITRO CELLULOSE, Schleicher & Schuell 社) へ転写した。anti-FLAG モノクローナル抗体 (SIGMA 社) および anti-Myc (9E10) モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) をそれぞれ 1/8000、1/1000 に 5% スキムミルク/PBST (0.1% Tween20/PBS) 中に希釈し、抗体反応に用いた (室温、1 時間)。PBS で洗浄後、2% スキムミルク/PBST 中へ 1/5000 に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識 anti-マウス Ig 抗体 (ウサギ) (DAKO 社) を反応させた後 (室温、1 時間)、ECL (Amersham Pharmacia Biotech 社) にて検出した。

謝辞

本研究で用いたニワトリ *L-fng* cDNA は Clif ford Tabin 博士 (ハーバード医大) から、マウス *Notch ΔE* および *Notch LNG* は Raphael Kopan 博士 (ワシントン大学) から、ニワトリ *Notch1* cDNA 断片は若松義雄博士 (東北大学) から頂きました。また QCPN 抗体を青山裕彦博士 (広島大) と中川真一博士 (理化学研究所) からいただきました。ありがとうございました。

胚操作の基本からポスターのつくり方まで、全くの白紙状態で研究を始めた私に多くのことを教えてくださった利根川あかねさん、凍結切片作製法を教えてくださった阪上起世さん、ウエスタンブロッティング法を教えてくださった越智陽城くん、顕微鏡やエレクトロポレーターの管理をしてくださった末次里奈子さんと仲矢由紀子さん他、日々の実験を行うにあたり様々な助言をくださった分子発生生物学講座の皆様感謝いたします。また卒業生の長谷川武宏くんには発現ベクターの作製を手伝っていただきました。利根川さんには QCPN 抗体を大量に頂きました。ありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、直接指導していただいた高橋淑子 客員助教授に深く感謝いたします。この5年間、体節の研究を思う存分でき、充実した研究生活を送ることができました。論理的に考えることや、研究成果をわかりやすく人に伝える方法についても熱心に指導していただき、たいへん勉強になりました。

そしてこのような研究の機会を与えてくださった影山龍一郎 教授ならびに安田國雄 副学長に心から感謝いたします。

参考文献

- Barrantes, I. B., Elia, A. J., Wunsch, K., De Angelis, M. H., Mak, T. W., Rossant, J., Conlon, R. A., Gossler, A., and de la Pompa, J. L. (1999). Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* 9, 470-80.
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of *Hes7* in somite segmentation. *Genes Dev* 15, 2642-7.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch \ni Delta interactions. *Nature* 406, 411-415.
- Catala, M., Teillet, M. A., De Robertis, E. M., and Le Douarin, M. L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599-610.
- Cauthen, C. A., Berdougo, E., Sandler, J., and Burrus, L. W. (2001). Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech Dev* 104, 133-8.
- Cole, S. E., Levorse, J. M., Tilghman, S. M., and Vogt, T. F. (2002). Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Dev Cell* 3, 75-84.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121, 1533-45.
- Cooke, J. (1998). A gene that resuscitates a theory--somitogenesis and a molecular oscillator. *Trends Genet* 14, 85-8.
- Dale, K. J. and O. Pourquie (2000). "A clock-work somite." *Bioessays* 22(1): 72-83.
- Dale, J. K., Maroto, M., Dequeant, M. L., Malapert, P., McGrew, M., and Pourquie, O. (2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275-8.

- Davis, R. L., Turner, D. L., Evans, L. M., and Kirschner, M. W. (2001). Molecular targets of vertebrate segmentation: two mechanisms control segmental expression of *Xenopus hairy2* during somite formation. *Dev Cell* 1, 553-65.
- Dubrulle, J., McGrew, M. J., and Pourquie, O. (2001). FGF Signaling Controls Somite Boundary Position and Regulates Segmentation Clock Control of Spatiotemporal *Hox* Gene Activation. *Cell* 106, 219-232.
- Dubrulle, J., and Pourquie, O. (2002). From head to tail: links between the segmentation clock and antero- posterior patterning of the embryo. *Curr Opin Genet Dev* 12, 519-23.
- Durbin, L., Sordino, P., Barrios, A., Gering, M., Thisse, C., Thisse, B., Brennan, C., Green, A., Wilson, S., and Holder, N. (2000). Anteroposterior patterning is required within segments for somite boundary formation in developing zebrafish. *Development* 127, 1703-13.
- Evrard, Y. A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L., and Johnson, R. L. (1998). lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* 394, 377-81.
- Freitas, C., Rodrigues, S., Charrier, J. B., Teillet, M. A., and Palmeirim, I. (2001). Evidence for medial/lateral specification and positional information within the presomitic mesoderm. *Development* 128, 5139-47.
- Funahashi, J., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., and Nakamura, H. (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev Growth Differ* 41, 59-72.
- Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12, 1751-62.
- Graef, I. A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A., and Crabtree, G. R. (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105, 863-75.
- Hamblet, N. S., Lijam, N., Ruiz-Lozano, P., Wang, J., Yang, Y., Luo, Z., Mei, L., Chien, K. R., Sussman, D. J., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Development* 129, 5827-5838.

- Heitzler, P., and Simpson, P. (1993). Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions. *Development* 117, 1113-23.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-90.
- Hicks, C., Johnston, S. H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T. F., and Weinmaster, G. (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* 2, 515-20.
- Hirano, S., Tanaka, H., Ohta, K., Norita, M., Hoshino, K., Meguro, R., and Kase, M. (1998). Normal ontogenic observations on the expression of Eph receptor tyrosine kinase, Cck8, in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)* 197, 187-97.
- Holder, N., and Klein, R. (1999). Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126, 2033-44.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717-21.
- Huang, R., Zhi, Q., Schmidt, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B., and Christ, B. (2000). Sclerotomal origin of the ribs. *Development* 127, 527-32.
- Ju, B. G., Jeong, S., Bae, E., Hyun, S., Carroll, S. B., Yim, J., and Kim, J. Fringe forms a complex with Notch. *Nature* 405, 191-5.
- Kato, N., and Aoyama, H. (1998). Dermomyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. *Development* 125, 3437-43.
- Keller, R. (2000). The origin and morphogenesis of amphibian somites. *Curr Top Dev Biol* 47, 183-246.
- Keynes, R. J., and Stern, C. D. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* 310, 786-9.

- Kim, S. H., Jen, W. C., De Robertis, E. M., and Kintner, C. (2000). The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr Biol* 10, 821-30.
- Krull, C. E., Lansford, R., Gale, N. W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G. D., Fraser, S. E., and Bronner-Fraser, M. (1997). Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol* 7, 571-80.
- Kulesa, P., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. (2000). In ovo time-lapse analysis after dorsal neural tube ablation shows rerouting of chick hindbrain neural crest. *Development* 127, 2843-52.
- Kusumi, K., Sun, E. S., Kerrebrock, A. W., Bronson, R. T., Chi, D. C., Bulotsky, M. S., Spencer, J. B., Birren, B. W., Frankel, W. N., and Lander, E. S. (1998). The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. *Nat Genet* 19, 274-8.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F., and Tabin, C. (1997). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386, 366-73.
- Le Douarin, N., and Kalcheim, C. (1999). *The neural crest*, 2nd edition Edition: Cambridge university press.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, H. S., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., and Vogt, T. F. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369- 375.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41, 335-44.
- Morales, A. V., Yasuda, Y., and Ish-Horowicz, D. (2002). Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to notch signaling. *Dev Cell* 3, 63-74.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-9.

Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., and Saga, Y. (2002). Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development* 129, 2473-81.

Obata, S., Sago, H., Mori, N., Rochelle, J. M., Seldin, M. F., Davidson, M., St John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. T. (1995). Protocadherin Pcdh2 shows properties similar to, but distinct from, those of classical cadherins. *J Cell Sci* 108, 3765-73.

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18, 2196-207.

Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W., and Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* 121, 3291-301.

Ozaki, J., Kondo, S. (2001). Reaction-diffusion control in somitogenesis. *Dev Growth Differ* 43, S143.

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-48.

Palmeirim, I., Dubrulle, J., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (1998). Uncoupling segmentation and somitogenesis in the chick presomitic mesoderm. *Dev Genet* 23, 77-85.

Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912.

Park, W. J., Liu, J., and Adler, P. N. (1994). The frizzled gene of *Drosophila* encodes a membrane protein with an odd number of transmembrane domains. *Mech Dev* 45, 127-37.

Primmett, D. R., Norris, W. E., Carlson, G. J., Keynes, R. J., and Stern, C. D. (1989). Periodic segmental anomalies induced by heat shock in the chick embryo are associated with the cell cycle. *Development* 105, 119-30.

Psychoyos, D., and Stern, C. D. (1996). Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. *Development* 122, 3263-73.

Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., De La Pena, J., Foys, B., Eshelman, B., and Belmonte, J. C. (1997). Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 386, 360-6.

Saga, Y., and Takeda, H. (2001). The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat Rev Genet* 2, 835-45.

Sato, Y., Yasuda, K., and Takahashi, Y. (2002). Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development* 129, 3633-44.

Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y. J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., and Takeda, H. (2001). Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 128, 4873-80.

Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-6.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-39.

Suetsugu, R., Sato, Y., and Takahashi, Y. (2002). Pax 2 expression in mesodermal segmentation and its relationship with *EphA4* and *Lunatic-fringe* during chicken somitogenesis. *Gene Expression Patterns* 2, 157-161.

Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., and Saga, Y. (2000). *Mesp2* initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nat Genet*

25, 390-6.

Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N., and Takahashi, Y. (1997). Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development* 124, 1975-1984.

Tonegawa, A., Kasai, T., and Takahashi, Y. Systematic screening for signaling molecules expressed during somitogenesis by the signal sequence trap method. (投稿中)

Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M., and Uemura, T. (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* 98, 585-95.

Wakamatsu, Y., Maynard, T. M., Jones, S. U., and Weston, J. A. (1999). NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* 23, 71-81.

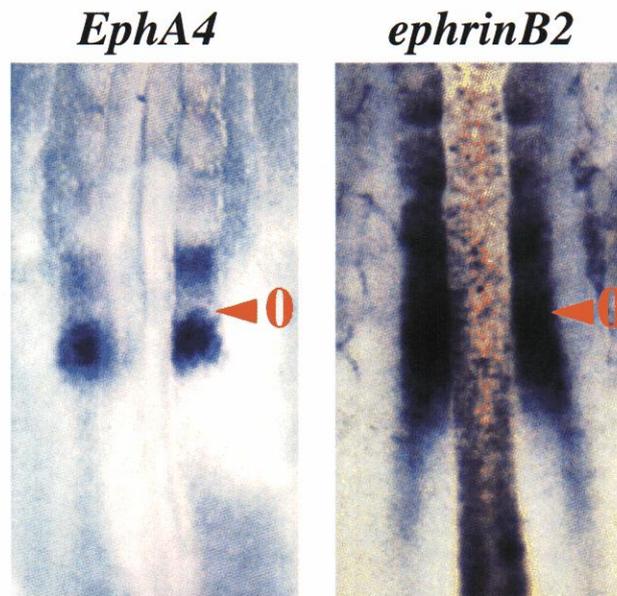
Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H., and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and DIII expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288-92.

Yamamoto, A., Kemp, C., Bachiller, D., Geissert, D., and De Robertis, E. M. (2000). Mouse paraxial protocadherin is expressed in trunk mesoderm and is not essential for mouse development. *Genesis* 27, 49-57.

Yasuda, K., Momose, T., and Takahashi, Y. (2000). Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Dev Growth Differ* 42, 203-6.

Zeltser, L. M., Larsen, C. W., and Lumsden, A. (2001). A new developmental compartment in the forebrain regulated by Lunatic fringe. *Nat Neurosci* 4, 683-4.

Zhang, N., and Gridley, T. (1998). Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* 394, 374-7.



(補足図) PSM における *EphA4* および *ephrinB2* の発現パターン
EphA4 は形成中の分節境界 (レベル 0 および +1) の後側領域にストライプ状に発現する。*ephrinB2* は PSM の前方 (レベル 0 付近) で発現する。