

マウス発生過程における *mab-21* 遺伝子の役割

山田 竜一

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物代謝調節学講座

(高橋 直樹 教授)

平成15年1月31日提出

所属 (主指導教官)	動物代謝調節学講座 (高橋 直樹 教授)		
氏名	山田 竜一	提出	平成15年 1月 7日
題目	マウス発生過程における <i>mab-21</i> 遺伝子の役割		
<p> <i>Hox</i> 遺伝子群は脊椎動物の発生過程において重要な役割を果たす転写調節因子をコードする遺伝子群であると考えられている。発生過程における <i>Hox</i> 遺伝子群の機能を解明するためには <i>Hox</i> 遺伝子転写産物が発現制御している標的遺伝子の同定、解析が重要である。<i>Mab21ll1</i> は抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により HOXC4 の標的候補遺伝子として同定された遺伝子であり、線虫の <i>mab-21</i> 遺伝子のマウスホモログであった。<i>mab-21</i> は線虫の <i>Hox</i> 遺伝子である <i>egl-5</i> との遺伝学的な関係が報告されている。このことは、<i>Mab21ll1/mab-21</i> がマウス、線虫において共通の <i>Hox</i> 標的遺伝子である可能性を示唆している。線虫 <i>mab-21</i> の変異体は胚生致死、あるいは生殖感覚器の形成異常を起こすことが知られている。また、<i>mab-21</i> は線虫、マウスのみならず、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、カエル、ヒトでも高度に保存されており、発生過程において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、<i>mab-21</i> ファミリーは既知の遺伝子と相同性が無いため、その機能に関しては全く未知である。そこで、本研究は <i>Mab21ll1</i> 遺伝子の発生過程における役割を明らかにすること、さらに <i>Mab21ll1</i> と <i>Hox</i> 遺伝子の関係を明らかにすることを目的とした。 </p> <p> <i>Mab21ll1</i> の発現様式を明らかにするために、<i>in situ hybridization</i> を行った。その結果、発生過程において <i>Mab21ll1</i> は中枢神経系、目、生殖器等に発現することが判明した。<i>Mab21ll1</i> の生体内での役割を明らかにするために、<i>Mab21ll1</i> 遺伝子欠損マウスを作製した。<i>Mab21ll1</i> 欠損マウスは肋骨にホメオティック変異が認められ、<i>Hoxc4</i> 遺伝子欠損マウスの表現型との類似性が示された。そこで、<i>Mab21ll1/Hoxc4</i> 二重欠損マウスを作製したところ、ホメオティック変異を示す個体の割合に増加が認められ、<i>Mab21ll1</i> と <i>Hoxc4</i> の遺伝学的相互作用が示された。さらに、<i>Mab21ll1</i> 欠損マウスは水晶体、および包皮腺に形態形成異常が認められた。水晶体胞の形成不全に付随して、水晶体形成に関わることが知られる <i>Foxe3</i> の発現減少、および細胞増殖率の低下が示された。一方、水晶体形成関連遺伝子 <i>Pax6</i>, <i>Sox2</i>, <i>Six3</i>, <i>c-maf</i> 等の発現に変化は観られなかった。また、<i>Pax6</i> 突然変異マウスにおいて <i>Mab21ll1</i> の発現が減少していたことから、<i>Mab21ll1</i> と <i>Pax6</i> の遺伝学的相互作用が示された。さらに、水晶体形成における <i>Mab21ll1</i> の役割を明らかにするために、<i>Mab21ll1</i>-/-細胞と Wild-type 細胞から構成されるキメラマウスを作製した。キメラマウスにおける各細胞の組織分布を </p>			

調べた結果、*Mab2111*^{-/-}細胞は網膜で認められたが、水晶体には全く認められなかった。このことから、水晶体形成において *Mab2111* は細胞自律的に機能することが示唆された。

マウスには *mab-21* ファミリーに属する *Mab2112* が存在する。*Mab2111/12* はその発現パターン、アミノ酸配列の類似性から発生過程において類似した役割を担っていると考えられる。また、*Mab2111* 欠損マウスの表現型が、*Mab2111/12* の共発現領域では認められず、*Mab2111* が単独で発現している領域に局限して観られたことから、両遺伝子が機能的に補償しうると考えられた。そこで、*Mab2112* 欠損マウスを作製し、*Mab2111* 欠損マウスの表現型と比較した。*Mab2112* 欠損マウスは網膜、および腹部体壁に形態形成異常が認められ、胎生致死であった。網膜、腹部体壁における *Mab2112* の顕著な発現は *Mab2112* 欠損マウスの形態形成異常を無理なく説明しうるものであった。さらに、*Mab2111/12* 二重欠損マウスを作製したところ、*Mab2111/12* 二重ヘテロマウス(+/-,+/-)、および *Mab2111* 単独のホモマウス(-/-,+/-)は正常に生育するのに対し、*Mab2111* ホモ、*Mab2112* ヘテロマウス(-/-,+/-)は生後3週間で致死であった。以上の結果から、*Mab2112* は網膜、および腹部体壁形成において重要な役割をもつことが明らかとなった。また、*Mab2111* と *Mab2112* は生体内で類似した機能を持つことが示唆された。

Mab2111 の分子機能を明らかにするために、MAB21L1 結合タンパク質の探索を行った。マウス胎仔抽出液より GST-MAB21L1 融合タンパク質に特異的に結合するバンドを検出し、ペプチドシーケンスを行った。その結果 MAB21L1 結合タンパク質として、KH ドメインを有する RNA 結合タンパク質、Sam68 (Src-associated in mitosis, 68 kDa) を同定した。免疫沈降法、細胞染色の結果から細胞内における MAB21L1 と Sam68 の結合、および共局在が示された。さらに、MAB21L1 の N 末端側の領域と Sam68 の KH ドメイン付近の領域が結合することが判明した。次に、Sam68 の活性に対する MAB21L1 の影響を検討するために、Rev-CAT assay を行った。その結果、MAB21L1 は Sam68 の活性を増強することが判明した。

本研究により、マウス発生過程において *mab-21*(*Mab2111/12*) 遺伝子は包皮腺、肋骨、網膜、腹部体壁の形成において重要な役割を果たすことが明らかとなった。特に水晶体形成において、*Mab2111* は細胞自律的に機能することが示唆された。生体内における *mab-21* の分子機能は依然として不明であるが、このような機能未知分子の解析を通じ、発生現象を理解する上で重要な知見を得たと考える。

目次

序論	1
図、表	6
第一章 <i>Mab21l1</i> と <i>Hox</i> 遺伝子の遺伝学的関係	11
1-1 序	12
1-2 結果	14
1-3 考察	18
図、表	25
第二章 水晶体形成における <i>Mab21l1</i> の役割	36
2-1 序	37
2-2 結果	39
2-3 考察	46
図	50
第三章 網膜、および腹部体壁における <i>Mab21l2</i> の役割	62
3-1 序	63
3-2 結果	65
3-3 考察	73
図、表	81
第四章 <i>mab-21</i> 遺伝子の分子機能に関する研究	95
4-1 序	96
4-2 結果	98
4-3 考察	104
図	107
総括	117
材料と方法	120
謝辞	126
引用文献	127

序論

多細胞動物の体は、単細胞である受精卵から多種多様な細胞が生じ、細胞増殖、細胞分化、細胞移動等の複雑な現象が的確に協調しあい、前後軸、背腹軸、遠近軸に沿った極性に仕上がった組織形成、器官形成を経て発生する。発生現象は個体もつ「全ゲノム情報」が時間的、空間的制御下において「機能」として変換された結果として生じると考えられる。転写調節因子は、遺伝子発現を制御することが知られており、「ゲノム情報の抽出」という全ての発生現象の基盤を構築する役割を担っている。

ホメオティック変異は、ショウジョウバエの遺伝学から見い出された(Scott et al., 1983)。 *Antenapedia (Antp)* と呼ばれる変異体は、本来の触覚に換わり脚が異所的に形成され、 *Ultrabithorax(Ubx)* と呼ばれる変異体は、胸部体節が前方化し本来双翅目であるショウジョウバエから4枚の翅が形成される(Duncan, 1987; Schneuwly et al., 1987)。これらの変異体の原因遺伝子は、いずれも180塩基対の保存されたDNA配列を持つことが明らかになり、この領域はホメオボックスと命名された(McGinnis et al., 1984; Scott and Weiner, 1984)。 *Antp* と *Ubx* は同一染色体上に位置し、その他のホメオティック遺伝子を含む *Antp/Ubx complex* を形成する(Scott et al., 1983)。その後、ホメオボックスには60アミノ酸残基のホメオドメインがコードされ、helix-turn-helix型のDNA結合モチーフを含むことが明らかにされた(Qian et al., 1989)。現在までに、ホメオボックスを含む遺伝子は数多く知られ、脊椎動物には数百のホメオボックス遺伝子が存在することが明かにされている。マウスでは *Antp/Ubx complex* の ortholog として39個のホメオボックス遺伝子を含む4つのクラスターが同定され、これらは *Hox* 遺伝子群として知られている(図1)(Kessel and Gruss, 1990; Krumlauf, 1992; McGinnis and Krumlauf, 1992; Scott, 1992; Scott, 1993)。

Hox 遺伝子群は脊椎動物の発生過程において中心的な役割を果たす転写因子をコードする転写因子群であると認識されている(Krumlauf, 1994)。また、*Hox* 遺伝子群に含まれる遺伝子は染色体上での順列と前後軸、基部先端軸における発現パターンが動物種を越えて保存されている(colinearity)(McGinnis and Krumlauf, 1992)。このことから *Hox* 遺伝子の増減と形態の多様化の関連が議論されている(Hughes and Kaufman, 2002; Kenyon, 1994; Meyer, 1998)。種々のノッ

クアウトマウス、トランスジェニックマウス、自然突然変異体の解析から、*Hox* 遺伝子群は脊髄や脊椎の前後軸、肢芽の遠近軸に沿った位置決定をする役割を持つことが知られている(Bruneau et al., 2001; Condie and Capecchi, 1994; Davis and Capecchi, 1994; Kmita et al., 2002; Suemori et al., 1995; van den Akker et al., 2001; Zakany et al., 1997)。また、腎臓、精巣、消化管等、様々な器官の発生過程でも *Hox* 遺伝子の重要性が示されている(Boulet and Capecchi, 1996; Godwin and Capecchi, 1998; Greer and Capecchi, 2002; Stadler et al., 2001; Zhao and Potter, 2002)。*Hox* 遺伝子は細胞分化のみならず、細胞増殖や細胞死を制御することが知られる(Duboule, 1995)が、このような細胞機能とホメオティック変異の要因の関連はほとんど明らかにされていない。また、生体内で *Hox* により直接発現制御される標的遺伝子はほとんど知られておらず、したがって *Hox* 遺伝子の転写調節因子としての機能もほとんど解っていない(Krumlauf, 1994)。これまでに明らかにされたマウスとショウジョウバエで共通する *Hox* 遺伝子の主な分子機能は、*Hox* 遺伝子がそれ自身の転写制御を行うこと (auto-regulation)、および、後方に発現する *Hox* 遺伝子はそれより前方で発現する *Hox* 遺伝子の発現を抑制していること (posterior prevalence) である(Andrew and Scott, 1992)。また、Trithorax Group(Tr-G), Polycomb Group(Pc-G)等により *Hox* 遺伝子が発現制御されること(Bel et al., 1998; Bel-Vialar et al., 2000; Hanson et al., 1999; Suzuki et al., 2002)、および、レチノイン酸に対する *Hox* 遺伝子発現の応答性が知られている(Kessel and Gruss, 1991; Marshall et al., 1992; Morrison et al., 1996)。これに対し、*Hox* 遺伝子がどのような標的遺伝子をいかにして発現制御するかはほとんど知られていない。

Andrew と Scott は *Hox* 標的遺伝子に必要な 3 つの基準を提案している(Andrew and Scott, 1992)。その基準とは 1) その遺伝子の発現が変異体を用いた *Hox* 遺伝子の発現変化により引き起こされること、2) その遺伝子の発現制御領域に *Hox* 遺伝子産物が *in vitro* で結合すること、3) その遺伝子の発現制御領域に *Hox* 遺伝子産物が *in vivo* で結合すること、あるいはその発現制御領域とレポーターの融合遺伝子が、生体内で *Hox* 遺伝子産物により制御されることである。ショウジョウバエにおいてはこの 3 つの基準を満たす標的遺伝子がいくつか同定されている。最も研究が進んでいる例は *Ubx* の標的遺伝子であり、*TGF- β family* に属する *decapentaplegic(dpp)*(Capovilla et al., 1994)、神経-筋肉結合に関わる細胞接着分子 *connectin*(Gould and White, 1992)、神経発生に関与する分泌性

タンパク質 *scabrous*(*sca*) (Graba et al., 1992)はいずれも3つの基準を満たす標的遺伝子であることが明らかになっている。これらの標的遺伝子は全て UBX に対する抗体を用いた染色体免疫沈降法(Gould et al., 1990)により、UBX と標的遺伝子の制御領域が *in vivo* で結合することが証明されている。一方、脊椎動物における *Hox* 標的遺伝子で前述の3つの基準を満たすものは現在までに報告されていない。これまでに報告された主な *Hox* 標的遺伝子を(表) (Bromleigh et al. 2000; Care et al., 1996; Guazzi et al., 1994; Jones et al., 1992; Morsi El-Kadi et al., 2002; Penkov et al. 2000; Pan, et al. 2001; Raman et al., 2000; Safaei et al., 1997; Shi et al., 2001; Tkatchenko et al., 2001; Tomotsune et al., 1993)に示した。*Hoxb8*, *Hoxb9*, *Hoxc6* の共通の標的遺伝子として報告されている細胞接着分子 N-CAM(Jones et al., 1993; Jones et al., 1992)は *Hox* 遺伝子産物を強制発現させた培養細胞において発現制御されることが確認されている。しかし、基準1)、3) を満たす結果は全く確認されておらず、生体内における *Hox* の役割との関連は全く示されていない。*Hoxb3* の標的遺伝子として報告されている Tyroid transcription factor-1(TTF-1) (Guazzi et al., 1994)に関しても、N-CAM の場合と同様である。哺乳類において、基準3) を満たすものは限られており、筆者の研究室で *Hoxc8* の標的遺伝子として同定された *mgl-1*(*mammalian homologue of Drosophila lethal (2) giant larvae*) (Tomotsune et al., 1993)と、Safaei により同定された *Hoxb5* 標的遺伝子 SPI3 (serine protease inhibitor) (Safaei, 1997)のみである。これらの *Hox* 標的遺伝子は染色体免疫沈降法により同定され、生体内で *Hox* 遺伝子産物が発現調節領域に直接結合することが示唆される。しかしながら、*mgl-1* と SPI3 は生体内における役割が明らかにされておらず、かつ両遺伝子に対する *Hox* による発現制御は示されておらず、*Hox* の発生過程における役割を説明するには至っていない。

友常と高橋は、*Hoxc4* 標的遺伝子を同定する目的で、HOXC4 タンパク質に対する抗体を用いた染色体免疫沈降法により、生体内で HOXC4 が直接結合する DNA 断片を濃縮し、単離することに成功した。単離された DNA 断片は線虫 *mab-21* 遺伝子のマウス ortholog (*Mab21l1*)近傍のゲノム DNA であった(図2) (Tomotsune, 1994)。

mab-21 遺伝子は線虫において、細胞の運命決定に関連する因子として同定された(Baird et al., 1991)。線虫では、雄の生殖感覚器である ray に形成異常を示す変異体は *male abnormal*(*mab*)と呼ばれる。hypomorphic allele の *mab-21* 変異

体は ray 4 が ray 6 に変換し、結果として ray が融合する表現型を示す(図 3)(Chow et al., 1995)。egl-5 は Abdominal-B 型の Hox 遺伝子であり、mab-21 と同様に ray が融合する表現型を示す。また、mab-18 は Pax6 の線虫 ortholog であり、ray が融合する表現型を示す。遺伝学的解析から、mab-21, egl-5, mab-18 は共通の遺伝学的経路で働き、ray の発生過程で重要な役割を担うことが明らかにされている(Chow and Emmons, 1994)。mab-21 変異体は ray 形成異常の他に、体長異常(短く太くなる)、と運動障害を示すことから、表皮と神経系でも重要な役割をもつことが示唆されている。null allele の mab-21 変異体は胚性致死であり、モザイク解析の結果から MAB-21 は細胞自律的にも細胞非自律的にも働き、細胞の運命を決定する役割をもつことが示唆されている(Chow et al., 1995)。しかしながら、mab-21 の分子機能は全く不明である。

今までの研究により、mab-21 は無脊椎動物から脊椎動物まで高度に保存されていることが示されている(図 4)(Mariani et al., 1999; Wong and Chow, 2002b)。ヒトの mab-21 ortholog は網膜の cDNA library から単離された(Margolis et al., 1996)。筆者らのグループとは別に、マウス胎仔脳から新規遺伝子を探索する過程で mab-21 ortholog が単離された(Mariani et al., 1998)。これまでに、mab-21 ortholog はショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、カエル、ニワトリ、マウス、ヒトから 2 つずつ単離され、Mab21l1、Mab21l2 と命名された(Ho et al., 2001; Lau et al., 2001; Mariani et al., 1999; Mariani et al., 1998; Wong et al., 1999; Wong and Chow, 2002b)。これに対し、線虫では近縁種である *C.elegans* と *C. briggsae* から mab-21 遺伝子は 1 つしか同定されていない(Ho et al., 2001)。全ての脊椎動物 MAB-21 タンパク質は、アミノ酸配列が 90% 以上の相同性を示す(図 4B)。

最近、mab-21 ファミリーの脊椎動物の発生過程における重要性が、ゼブラフィッシュ、カエル、マウスを用いた解析から示唆された。ゼブラフィッシュの *Acerebellar (ace)* 変異体と *no isthmus (noi)* 変異体で、Mab21l2 の発現が変化することから、Mab21l2 が中脳—後脳境界領域の形成に関連する可能性が示唆されている(Kudoh and Dawid, 2001)。また、RNA interference (RNAi) と antisense oligodeoxynucleotide (ODN) を用いた解析から、Mab21l2 が脊椎動物の正常発生に不可欠であることが示唆された(Lau et al., 2001; Wong and Chow, 2002a)。カエルにおいて、Mab21l2 の発現を阻害すると、脊索や眼の形成不全に加え、原腸陥入や神経発生に異常が生じることが示された(Lau et al., 2001)。マウスでは Mab21l1 と Mab21l2 を単独、あるいは両方の発現阻害により、神経管の閉塞異

常、脊索、眼、体節の形成不全が起こることが示された(Wong and Chow, 2002a)。これらの結果は、線虫のみならず脊椎動物においても *mab-21* ファミリーが重要な役割を持つことを示唆している。

mab-21 ファミリーは既知の遺伝子と全く相同性が無く、既存のモチーフやドメインも見出されない。したがって、アミノ酸配列一次構造からの機能予測は不可能である。生体内における役割は上記の方法により既に報告されているが、より正確に *mab-21* ファミリーの役割の全貌を明らかにするためには遺伝学的解析が必要であると考えられる。

そこで、本研究は *Mab21l1/Mab21l2* ノックアウトマウスを作出、解析することにより、*mab-21* ファミリーの発生過程における役割を明らかにすること、さらに *Mab21l1* と *Hox* 遺伝子の関係を遺伝学的解析により明らかにすることを目的とした。

本論文第一章では、*Mab21l1* の肋骨形成における役割を明らかにすると共に、*Mab21l1* と *Hoxc4* の遺伝学的相互作用を示した。第二章では *Mab21l1* の水晶体形成過程における役割を明らかにした。第三章では *Mab21l2* の網膜形成、および腹側体壁形成過程における役割を明らかにした。第四章では *mab-21* ファミリーの分子機能の解明を試みた。

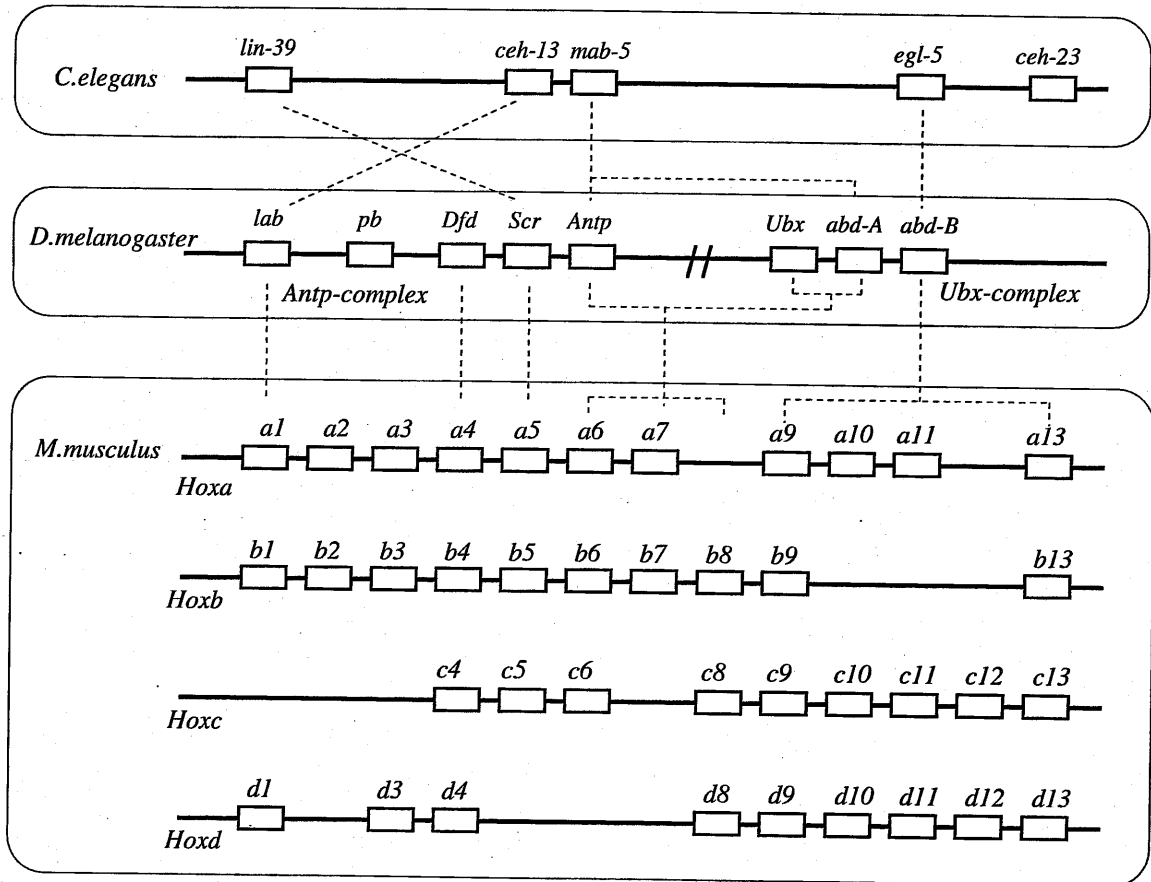


図1 線虫、ショウジョウバエのHOM-C遺伝子群とマウスのHox遺伝子群遺伝子を四角で示した。点線でそれぞれのorthologを示した。

<i>Hox gene</i>	Transcription activated(+) repressed(-)	in vivo binding	Target gene	Target gene class	Reference
<i>Hoxb1</i>	+	-	<i>COL5A2</i>	collagen	Penkov et al. 2000
<i>Hoxb3</i>	+	-	<i>TTF-1</i>	transcription factor	Guazzi et al. 1994
<i>Hoxb4</i>	-	-	<i>Xrap1</i>	small GTPase	Morsi EKIKadi et al. 2002
<i>Hoxc4</i>	?	+	<i>Mab2111</i>	unknown	This research
<i>Hoxa5</i>	+	-	<i>p53</i>	tumor suppressor	Raman et al. 2000
<i>Hoxb5</i>	+	+	<i>SPI3</i>	serin protease inhibitor	Safae, 1997
<i>Hoxb7</i>	+	-	<i>bFGF</i>	secreted protein	Care et al. 1996
<i>Hoxb8/9</i>	+	-	<i>N-CAM</i>	cell adhesion molecule	Jones et al. 1992
<i>Hoxc8</i>	?	+	<i>mg1-1</i>	tumor suppressor	Tomotsune et al. 1993
<i>Hoxa9</i>	-	-	<i>Osteopontin</i>	secreted protein	Shi et al. 2001
<i>Hoxa10</i>	+	-	<i>p21</i>	kinase inhibitor	Bromleigh and Freedman, 2000
<i>Hoxc13</i>	-	-	<i>Keratin</i>	structural protein	Tkatchenko et al. 2001
<i>Hoxa9/10, b9, c9, d10</i>	+	-	<i>Ren-1(c)</i>	renin	Pan et al. 2001

表、これまでに脊椎動物で同定された*Hox* 標的遺伝子

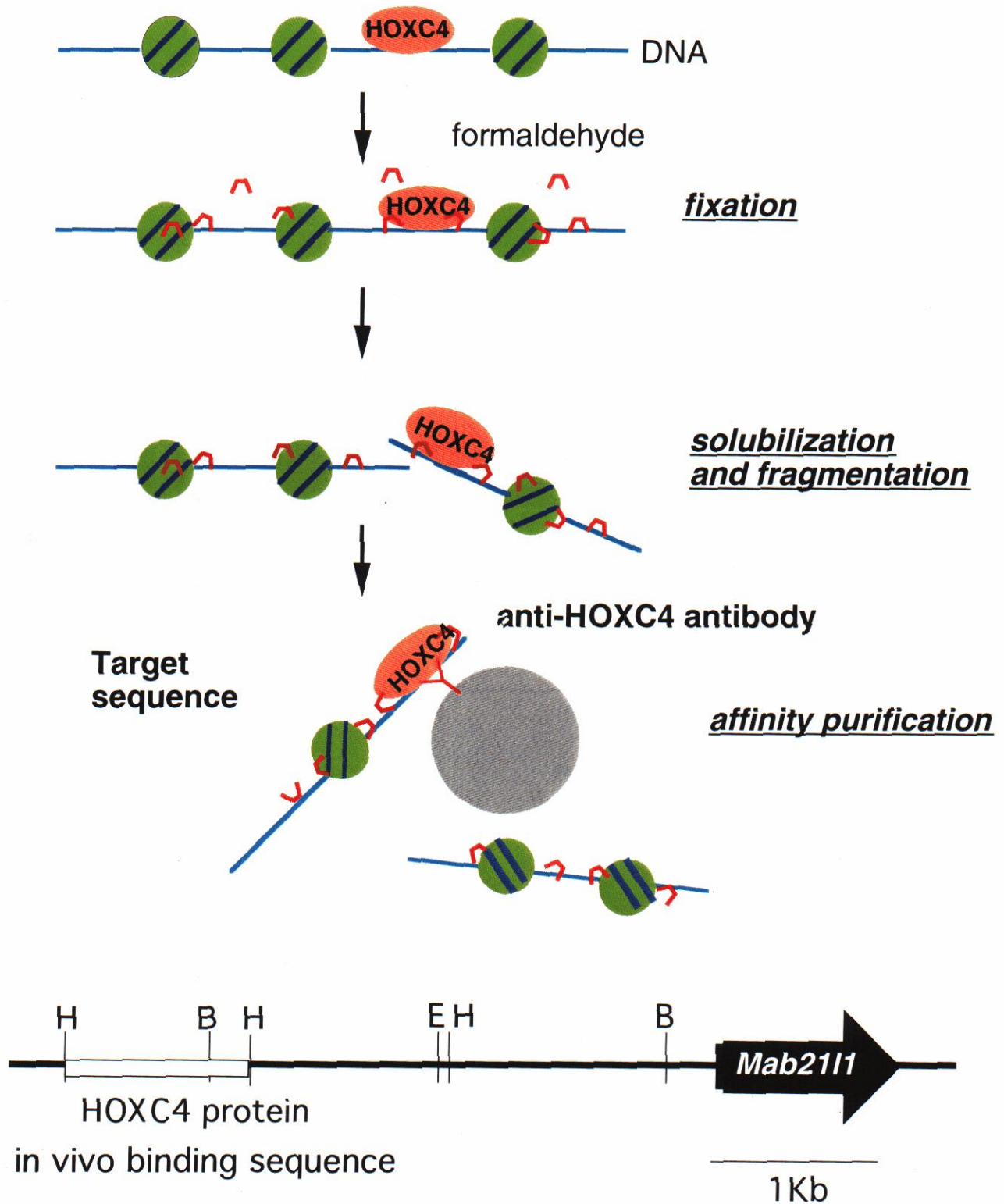
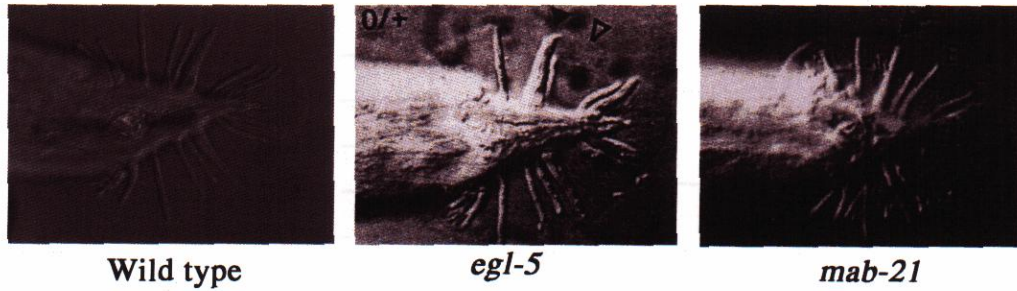


図2 HOXC4結合配列の免疫沈降法

マウス12、5日胚をパラホルムアルデヒドで固定した後、超音波処理でnucleo protein complexes を可溶化、断片化する。HOXC4を含むnucleoprotein complexes をアフィニティーカラムで濃縮する。nucleoprotein complexes からDNAを抽出し、vectorに挿入し、immunoenriched DNA libraryを作製する。さらにin vitroでの免疫沈降を行った後、zoo blot analysis, plaque hybridizationにより、HOXC4 標的候補遺伝子が同定された。同定された遺伝子はMab2111であり、HOXC4 in vivo 結合配列はORFの上流に位置していた。E, EcoRI, B, BamHI, H, HindIII。

(Tomotsune, et.al. 1993)

A**B**

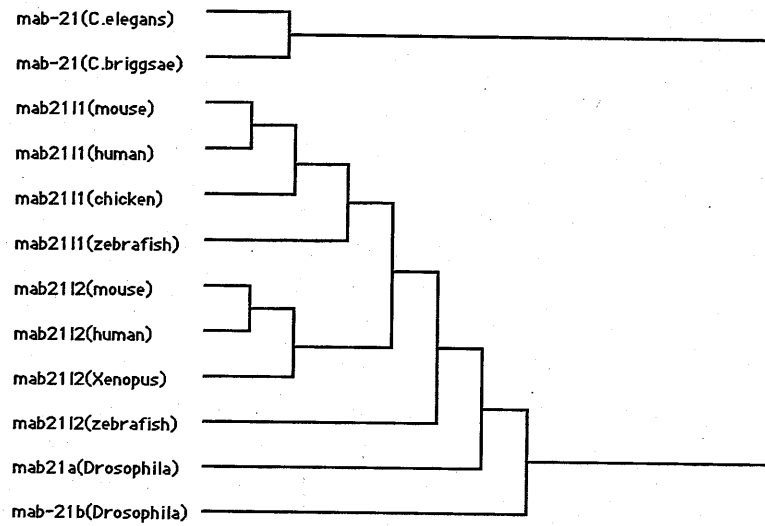
	Percentage ray transformation	
<i>+egl-5(n486)/++</i>	0(0/272)	7.0(19/272)
<i>+mab-21(bx53)/++</i>	0(0/272)	0(0/272)
<i>+egl-5(n486)/+mab-21(bx53)</i>	0(0/367)	31.6(116/367)

K.L.Chow and S.W.Emmons / Development 120,2579-2593 (1994)

図3 線虫 *mab-21* 変異体の表現型

(A) *egl-5*変異体と*mab-21*変異体（共にhypomorphic alleleのヘテロ接合型）は類似した生殖感覚器rayの形成異常を示す。本来9対あるrayの内、ray6がray4に形質転換しray4に融合する。(B)*egl-5*と*mab-21*は遺伝学的相互作用を示す。変異体の遺伝子型を左、rayが融合した個体数を右に示した。二重ヘテロ接合体はrayの融合が31.6%に増加する。

A



B

<i>C.elegans</i>																			
<i>C.briggsae</i>	94																		
<i>Drosophila-a</i>	55	54																	
<i>Drosophila-b</i>	55	54	76																
<i>Xenopus-l2</i>	54	55	75	71															
<i>zebrafish-l1</i>	55	56	76	71	93														
<i>zebrafish-l2</i>	54	54	74	72	95	92													
<i>chicken-l1</i>	56	56	75	71	93	97	94												
<i>mouse-l1</i>	56	56	75	71	93	97	94	100											
<i>mouse-l2</i>	54	54	75	72	97	93	96	94	94										
<i>human-l1</i>	56	56	75	71	93	97	94	100	100	94									
<i>human-l2</i>	55	54	75	73	97	93	97	94	94	99	94								
	<i>C.ele</i>	<i>C.bri</i>	<i>D-a</i>	<i>D-b</i>	<i>X-l2</i>	<i>Z-l1</i>	<i>Z-l2</i>	<i>ch-l1</i>	<i>m-l1</i>	<i>m-l2</i>	<i>h-l1</i>	<i>h-l2</i>							

アミノ酸配列の相同性 (%)

図4 *mab-21* ファミリー

A, アミノ酸配列比較から作製した*mab-21*ファミリーの進化系統樹。UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)法により作製したもの。

B, *mab-21*ファミリーのアミノ酸配列の相同性。

第一章

Mab21l1 と *Hox* 遺伝子の遺伝学的関係

1-1 序

Hox 遺伝子群の一種である *Hoxc4* は、マウス発生過程において後脳より尾側の中樞神経系や脊椎源基で発現することが知られている(Geada et al., 1992)。*Hoxc4* ノックアウトマウスは骨格形成においてホメオティック変異を示し、頸部脊椎では後方化(C7→T1)、胸部脊椎では前方化(T3→T2, T2→T1, T8→T7)が起こることが示されている(Boulet and Capecchi, 1996; Saegusa et al., 1996)。また、消化管形成の形成不全により、生後から離乳期にかけて致死性を示すことが知られている(Boulet and Capecchi, 1996)。*Hoxc4* と同じくシヨウジョウバエ *Deformed (Dfd)* の ortholog と考えられている *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxd4* も、そのノックアウトマウスで脊椎の前方化が起こることが示されている。したがって、*Dfd* 型の *Hox* 遺伝子は、典型的な *Hox* 遺伝子として体の前後軸に沿った位置決定に重要な役割を担っていると考えられる(Horan et al., 1995a; Horan et al., 1995b)。*Hox* 遺伝子はホメオドメインをコードするため、転写調節因子であると考えられている(Andrew and Scott, 1992)。これまでに示された多くの変異体は *Hox* 遺伝子の重要性を支持するものであるが、ホメオティック変異の要因と考えられる細胞分化、細胞増殖、細胞移動等の細胞機能に対する *Hox* 遺伝子の役割はほとんど明らかにされていない(Duboule, 1995)。また、*Hox* 標的遺伝子はほとんど知られておらず、ホメオティック変異を引き起こす分子的作用機序は全く明らかにされていない(Krumlauf, 1994)。生体内で *Hox* 遺伝子産物により直接発現制御される標的遺伝子を同定し、その標的遺伝子の役割を明らかにすることで、*Hox* 遺伝子の分子機能と発生過程における役割を説明できると考えられる。

Mab21l1 は筆者らの研究室で *Hoxc4* 標的遺伝子として単離され、線虫 *mab-21* 遺伝子の ortholog であった(Tomotsune et al., 1993; Tomotsune, 1994)。*mab-21* 遺伝子は線虫の *Hox* 遺伝子である *egl-5* と遺伝学的に相互作用することが知られる(Chow and Emmons, 1994)。したがって、*mab-21/Mab21l1* は線虫とマウスで保存された共通の *Hox* 標的遺伝子であると予想された。また、脊椎動物において *mab-21* ファミリーは高度に保存されていることから(Wong and Chow, 2002b) (序論図4)、発生過程において重要な役割を担うことが推察された。

そこで本章では、マウス発生過程における *Mab21l1/Mab21l2* の発現様式を明らかにすること、加えて、*Mab21l1* 遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス)

を作出、解析し、生体内における *Mab21l1* の役割を明らかにすること、さらに、*Hoxc4/Mab21l1* 二重遺伝子欠損マウスを用いた遺伝学的解析により、発生過程における *Hoxc4* と *Mab21l1* の関係を明らかにすることを目的とした。

1-2 結果

Mab21l1/2 転写産物の発現パターン

新規遺伝子である *Mab21l1/2* の発現パターンを特定するために、whole mount in situ hybridization を行った。マウス胎仔 E8.5 において、*Mab21l1* の発現は認められなかった。*Mab21l2* は E8.0~E8.5 から、中脳と心臓周辺の間充織に発現が認められた(data not shown)。*Mab21l1* は E9 以降に発現が認められ、中脳、鰓弓、肢芽等で *Mab21l2* の発現と重複していた(図 1-1 A, B)。発生段階の進行にしたがい、*Mab21l1* と *Mab21l2* の発現領域に顕著な差が認められた。E10.5 において *Mab21l1* は水晶体に特異的に発現し、*Mab21l2* は腹部体壁に強く発現していた(二章、三章参照)。E12 になると、発現領域の差はさらに顕著になり、頭部において *Mab21l1* は終脳、vibrissae に発現し、*Mab21l2* は下顎全体を覆うように発現していた(図 1-1 C)。genital tubercle(生殖結節)において *Mab21l1* は間充織に広く発現し、*Mab21l2* は先端部に局所的に発現していた(図 1-1 H, I)。

Mab21l1 と *Hoxc4* の発現領域の比較

Hoxc4 と *Mab21l1* の関係を検討するために、*Hoxc4* と *Mab21l1* の発現パターンを比較した。E12 の中枢神経系において、*Hoxc4* は随脳より尾側で発現することが知られている(Geada et al., 1992)。一方 *Mab21l1* は中脳より尾側で発現が認められ、両遺伝子が中枢神経系において共発現している可能性が示唆された(図 1-1 D, E)。そこで、詳細に発現パターンを比較するために、切片を製作し in situ hybridization を行った。随脳において、*Hoxc4* と *Mab21l1* の発現領域は一部重複が観られたが、全く異なる発現パターンを示した(図 1-2 A-F)。腹部付近の脊髄において *Hoxc4* と *Mab21l1* は subventricular zone の一部で共発現が認められたが、基本的には相補的な発現パターンを示した。*Mab21l2* は随脳において *Hoxc4* と共発現が認められ、腹部脊髄においては *Hoxc4* と相補的な発現パターンを示した(図 1-2 G-H)。一方、腹側体壁の間充織において、*Hoxc4* と *Mab21l1* の発現に重複が認められた。*Hoxc4/Mab21l1* 共発現領域において、*Mab21l2* の発現は観られなかった(図 1-3 A-F)。腹側体壁に発現し肋骨形成

に関わることが知られている *Bmp4*(Paine-Saunders et al., 2000; Sudo et al., 2001) は *Hoxc4/Mab21l1* の発現と重複が認められた (図 1-3H)。

Hoxc4 ノックアウトマウスにおける *Mab21l1* の発現

生体内での *Hoxc4* による *Mab21l1* の発現制御を確認するために、*Hoxc4* ノックアウトマウス(Saegusa et al., 1996)における *Mab21l1* 転写産物の発現パターンを解析した。*Hoxc4* が *Mab21l1* の発現制御領域に直接結合していると考えられる E12~E13 のマウス胎仔を用いて in situ hybridization を行った。この時期に *Hoxc4* と *Mab21l1* が共に発現している領域は髄脳より尾側の中樞神経系、前肢芽、食道である(Geada et al., 1992; Goto et al., 1993; Nelson et al., 1996)。これらの領域に注目し、野生型と *Hoxc4* $-/-$ マウス胎仔で *Mab21l1* の発現を比較したところ、顕著な差は認められなかった(data not shown)。その他の領域でも *Mab21l1* は *Hoxc4* $-/-$ マウスにおいて野生型と同様に発現しており、生体内における、*Hoxc4* 依存的な *Mab21l1* の発現変化は検出できなかった。

Mab21l1 遺伝子欠損マウスの作出

生体内での *Mab21l1* の役割を明らかにするために、*Mab21l1* 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。まず、129系統マウスゲノムライブラリーより単離された *Mab21l1* ORF を含むクローン(#737, Naoki Takahashi) の制限酵素地図を作製した。その結果、クローン#737 は *Mab21l1* ORF の上流約 6kb と下流約 8kb を含むことが判明した。#737 を用い、Targeting vector 作製した (図 1-4)。定法にしたがって、キメラマウス、および F1 マウスを作出し、サザンプロットにより遺伝子型を確認した (図 1-4B)。得られたヘテロ接合型マウスは正常であった。ヘテロマウスを交配し、得られた仔の遺伝子型を生後 3 週間目で確認した (図 1-4C)。野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型マウスの出現頻度はそれぞれ約 25%、50%、25%であり、メンデル比に合致した。このことから、*Mab21l1* は生存には不要であることが判明した。ホモ接合型マウスにおいて *Mab21l1* 転写産物が検出されないことから、このマウスが null mutant であることを確認した (図 1-4D)。

Mab2111 欠損マウスの表現型

Mab2111 欠損マウスは成体において眼、および外生殖器に形成異常が認められた。これらの表現型については後述する（本章後半、二章参照）。*Hoxc4* 欠損マウスは骨形成異常を起こすことが知られている (Boulet and Capecchi, 1996; Saegusa et al., 1996)。そこで、*Mab2111* と *Hoxc4* の関連性を検討するために、*Mab2111* 欠損マウスの骨形成パターンを解析した。ヘテロ接合体同士の交配で得た新生仔を骨染色し、実体顕微鏡下で観察した。その結果、*Mab2111* 欠損マウス（以下ヘテロ接合体を *Mab2111*+/-、ホモ接合体を *Mab2111*-/-と記す）は通常7本である胸骨に結合する肋骨が8本に増加していた（図1-5C）。また、胸骨先端部の Xiphoid process に穴、および亀裂が生じていた（図1-5D）。

Hoxc4/Mab2111 二重欠損マウスの表現型

Mab2111 欠損マウスで見出された骨形成異常は、既に報告されている *Hoxc4* 欠損マウスの表現型と類似していた (Boulet and Capecchi, 1996; Saegusa et al., 1996)。このことから、*Hoxc4* と *Mab2111* が骨形成過程において同一の遺伝学的経路で機能する可能性が示唆された。そこで、*Hoxc4* と *Mab2111* の遺伝学的相互作用を検討するために、*Hoxc4/Mab2111* 二重欠損マウスの作製を試みた。まず、*Hoxc4*+/-、あるいは *Hoxc4*-/- マウスと *Mab2111*+/-マウスを交配し、*Hoxc4/Mab2111* 二重ヘテロ接合型マウス (*Hoxc4*+/-, *Mab2111*+/-) を得た。*Hoxc4*+/-, *Mab2111*+/-同士の交配し、得られた新生仔の遺伝子型を PCR で確認した。342匹の新生仔と101匹の成体を解析した結果、それぞれの遺伝子型の出現頻度は予想されるメンデル比にほぼ合致した（表1-1）。このことから *Hoxc4* と *Mab2111* の二重欠損は生存には影響しないことが判明した。

遺伝子型が判別された新生仔を骨染色し、骨形成異常の頻度を定量化した。その結果、胸骨に結合する肋骨数、および総肋骨数に異常が観られる個体の頻度に増加傾向が見出された。これらの骨形成異常は有意水準 ($p < 0.02$) で、異常率に差があることを確認した（表1-2）。一方それぞれの単独欠損マウスで観られた Xiphoid process の形成異常は二重欠損マウスにおいて、異常率に有意な差が認められなかった。また、*Hoxc4* 単独欠損マウスに観られる dorsal process の形成異常 ($t2 < t3$)、および Transitional vertebrae の形成異常 ($t10 \rightarrow t11$) は

Mab21l1 欠損マウスでは認められず、二重欠損マウスにおいても、異常率に変化は観られなかった (表 1-2, 図 1-6)。

Mab21l1 欠損マウスの外生殖器形成異常と不妊症

Mab21l1 欠損マウスは骨形成異常の他に、成体雄において外生殖器の一部である包皮腺に形成異常が認められた (図 1-7)。組織学的解析から、*Mab21l1*-/-マウスの包皮腺において、内腔の萎縮が観察された (図 1-7F)。しかしながら、器官内部を構成する上皮構造、間充織、漿液腺房に顕著な異常は認められなかった (図 1-7H)。*Mab21l1*-/-マウスは雄、雌は共に野生型との自然交配で重度の不妊性を示した。雌の妊娠が認められたのは、(-/-♂ x +/+♀) の組み合わせで 20 組中 1 組、(+/+♂ x -/-♀) の組み合わせでは 20 組中 2 組であった。包皮腺以外の外生殖器、および内生殖器に異常は認められず、不妊症の原因は包皮腺形成異常により引き起こされると考えられた。

包皮腺は生後 2 週間以降に急速に器官形成が発達する器官でありることが知られている (Rudali et al., 1974)。そこで、発生過程の包皮腺における *Mab21l1* の発現を *in situ hybridization* により検討した。その結果、マウス新生仔の包皮腺源基において *Mab21l1* の発現が認められた。一方 *Mab21l2* の発現は観られなかった (図 1-8 A-C)。

包皮腺は古典的な切除実験によりフェロモン様物質を貯蔵している可能性が示唆されている (Bronson and Caroom, 1971; Ingersoll et al., 1986)。齧歯類において、フェロモン刺激は鋤鼻器官、副嗅球、扁桃体を含む鋤鼻嗅覚神経系を介して感知されることが知られている (Halpern, 1987; Segovia and Guillaumon, 1993)。*in situ hybridization* の結果、*Mab21l1* が鋤鼻器官、副嗅球、扁桃体、視床を含む鋤鼻嗅覚神経系に発現することが判明した (図 1-8 D, G)。一方 *Mab21l2* の発現は視床を除く鋤鼻嗅覚神経系では全く観られなかった (図 1-8 E, H)。

1-3 考察

Mab21l1 欠損マウスの表現型

Mab21l1 は発生過程において、中枢神経系、眼、鰓弓、肢芽等に発現する。これに対し、*Mab21l1* 欠損マウスは水晶体と包皮腺の形成異常と肋骨のホメオティック変異を示す。この、表現型と発現領域との不一致は *Mab21l2* の発現から説明される。*Mab21l2* は中枢神経系、鰓弓、肢芽で *Mab21l1* と重複して発現するが、水晶体、包皮腺源基では *Mab21l1* のみが発現する。このことは、*Mab21l1* の欠損を *Mab21l2* が補償しうることを示唆している。*Mab21l2* と *Mab21l1* はアミノ酸配列が94%相同(序論図4)であることから、*Mab21l2* と *Mab21l1* が生体内で類似した機能を持つことが予想される。

Mab21l1 欠損マウスの表現型は、最近報告された antisense oligodeoxynucleotide (ODN)を用いた解析結果とは異なるものであった。Wong と Chow は、*Mab21l1* を発現抑制したマウス胚において、神経管、notochord、眼、体節の形成不全に加え、胎仔の反転異常を示し、*Mab21l1* 欠損マウスと比較して重度の形態形成異常を報告している(Wong and Chow, 2002a)。本研究では *Mab21l2* 欠損マウス、および *Mab21l1/Mab21l2* 二重欠損マウスを作出したが、いずれも Wong と Chow の報告に比べ軽度の表現型を示した(三章参照)。複数のエクソンから構成される遺伝子の場合、エクソンの一部を欠失しても、活性が残存し hypomorphic allele となる可能性が考えられる。しかし、*Mab21l1* と *Mab21l2* は共にエクソンを一つしか持たず、本研究で作出した *Mab21l1* 欠損マウス、*Mab21l2* 欠損マウスはエクソンを全て欠失したものである。また、whole mount in situ hybridization により、*Mab21l1*, *Mab21l2* 転写産物の消失を確認した。よって、本研究で解析した *Mab21l1* 欠損マウス、および *Mab21l2* 欠損マウスは遺伝子の活性を完全に失った null allele であると結論した。したがって、Wong と Chow の報告は ODN による、他の遺伝子の非特異的な発現抑制、あるいはマウス胚の試験管内培養による影響を反映するものであると判断した。

ここでは肋骨の表現型に焦点をあて *Mab21l1* の役割を議論し、水晶体における役割、および *Mab21l1* と *Mab21l2* の機能的類似性については後述する(二章、三章)。*Mab21l1*-/-新生仔において、肋骨のホメオティック変異が認められた。移植実験の結果から、肋骨は Sclerotome に由来し、辺縁部側の形成には

dermomyotome と Sclerotome の相互作用が重要なことが知られている(Huang et al., 2000; Kato and Aoyama, 1998)Sclerotome 由来の細胞と、dermomyotome 由来の細胞が相互作用をしつつ側板中胚葉に進入し、腹側体壁と肋骨が形成されると考えられている(Brent and Tabin, 2002)。Pax3 は dermomyotome に発現し、そのノックアウトマウスは dermomyotome に異常を生じ、肋骨の形成不全を起こすことが知られている(Henderson et al., 1999)。また、Bmp4 は腹部体壁に発現し、肋骨形成に重要なことが示唆されている(Sudo et al., 2001)。E10~E10.5 において、Mab2111 は Pax3 陽性の dermomyotome では発現が認められず、その周辺の間充織で発現していた (data not shown)。E11.5 においては Mab2111 は腹側体壁近傍の間充織で発現が認められ、この発現領域は Bmp4 の発現と重複していた。また、この領域で、Hoxc4 の発現も重複していた。このことより、Mab2111 欠損マウスに見出された肋骨のホメオティック変異は dermomyotome ではなく、腹側体壁における Mab2111 の発現に由来すると考えられた。また、Mab2112 の発現は Mab2111 とは一致しないことから、腹部体壁の間充織において Mab2111 の欠損は Mab2112 で完全には補償されず、ホメオティック変異が現れると推察される。

Hoxc4 と Mab2111 の遺伝学的相互作用

Mab2111 で見出されたホメオティック変異は Hoxc4 欠損マウス(Saegusa et al., 1996)で観られるものと類似していた。Hoxc4/Mab2111 二重欠損マウスにおいて、肋骨におけるホメオティック変異は出現頻度が増加した。また肋骨形成に関連すると考えられる腹側体壁で両遺伝子の発現は重複していた。このことから、Hoxc4 と Mab2111 は肋骨形成過程で同一の遺伝学的経路で機能することが示唆される。胸骨に結合する肋骨数が 8 本になる割合は Hoxc4^{-/-}, Mab2111^{+/+}で 58%、Hoxc4^{+/+}, Mab2111^{-/-}で 19%、Hoxc4^{-/-}, Mab2111^{-/-}で 71%であった。この値はそれぞれの単独遺伝子欠損における変異個体の割合を加算したものにほぼ等しい。一方、Hoxc4^{-/-}, Mab2111^{+/+}で 58%、Hoxc4^{+/+}, Mab2111^{+/-}で 4%、Hoxc4^{-/-}, Mab2111^{+/-}で 75%であった。ここで観られた変異個体の割合は、それぞれを加算した値に比べ大きかった。このことから、Hoxc4^{-/-}の遺伝子型に対し、Mab2111 がヘテロになると、両遺伝子の欠損が表現型に対し相乗的相互作用を示すことが判明した。また、総肋骨数が 14 本になる個体の割合は、Hoxc4^{-/-},

Mab2111+/+5%、*Hoxc4*+/+、*Mab2111*-/-10%、*Hoxc4*-/-、*Mab2111*-/-35%であり、両遺伝子の相乗効果が認められた（カイ二乗検定において、*Hoxc4*-/-、*Mab2111*+/+:
Hoxc4-/-、*Mab2111*-/-、 $P<0.05$; *Hoxc4*+/+、*Mab2111*-/-: *Hoxc4*-/-、*Mab2111*-/-、 $P<0.025$ ）。同様に、腰部(Transitional vertebrae, t11)におけるホメオティック変異の割合でも、*Hoxc4*-/-、*Mab2111*+/+32%、*Hoxc4*+/+、*Mab2111*-/-10%、*Hoxc4*-/-、*Mab2111*-/-59%であり、*Hoxc4* と *Mab2111* の相乗的相互作用が認められた。これに対し、Xiphoid process の形成異常、および頸部におけるホメオティック変異 (dorsal process t2=t3, t2<t3) では、*Hoxc4* と *Mab2111* に顕著な遺伝学的相互作用は見出されなかった。これら、変異の割合が領域により異なることから、*Hoxc4* と *Mab2111* の遺伝学的相互作用は両遺伝子の発現領域の一部、特に肋骨形成過程で起こりうる事が判明した。

肋骨におけるホメオティック変異は *Hox* 遺伝子群の変異体、あるいは遺伝子欠損マウス全般に観られることが知られるが、その発症に関する分子的作用機構の解明には至っていない(Duboule, 1995; Zakany et al., 2001)。*Mab2111* 欠損マウスは脊椎動物で *Hox* 標的候補遺伝子として機能すると考えられる遺伝子で、その単独の欠損マウスがホメオティック変異を示す初めての例である。加えて、*Hox* 標的遺伝子としては、*Hox* 欠損マウスに観られるホメオティック変異の penetrance に影響を与えることが示された初めての例でもある。*Mab2111* 欠損マウスにおけるホメオティック変異の発症作用機序を明らかにすることで、*Hox* 遺伝子群の役割のみならず、形態形成を理解する上で重要な知見が得られるものと考えられる。

***Mab2111* と *Hoxc4* の 発現領域**

Mab2111 と *Hoxc4* の発現は、脊髄において、一部重複が観られたが主として相補的であった。このことから、脊髄における *Mab2111* の発現は *Hoxc4* により、抑制的に制御されると推察された。すなわち、*Hoxc4* が *Mab2111* を抑制的に発現制御しているならば、*Hoxc4* 欠損マウスにおいて *Mab2111* は異所的に発現すると考えられた。しかしながら、*Hoxc4* 欠損マウスと野生型マウスの脊髄において *Mab2111* の発現パターンに変化は検出できなかった (data not shown)。また、肢芽、腹側体壁、消化管等の *Mab2111* と *Hoxc4* の発現が重複して観られる領域でも、変化は検出できなかった。この結果は *Hoxc4* 欠損マウスでは中枢神

経系では形態形成に異常は観られないこと、さらに骨形成のホメオティック変異には個体差が観られ、*Hoxc4*^{-/-}の個体でも正常な骨形成パターンを示す個体が混在することからも予測された(Boulet and Capecchi, 1996; Saegusa et al., 1996)。これに加え、*Hoxa4*, *b4*, *c4*, *d4* の欠損マウスは単独では C2→C1(B4, D4), C3→C2(A4), C7→T1(A4, C4, D4)等の脊椎の前方化が認められ、*a4/b4/d4* の欠損を重複して持つ変異体では C1~C5 全てに前方化が起こるという現象が報告されている(Boulet and Capecchi, 1996; Horan et al., 1995a; Horan et al., 1995b; Saegusa et al., 1996)。これと同様の現象は他の *Hox* 欠損マウス(*a1/b1*; (Gavalas et al., 1998), *a4/a5*; (Aubin et al., 1998), *d11/d12/d13/a11/a13*; (Zakany et al., 1997))でも認められ、一般に、単独遺伝子の変異を同種の機能を持つ遺伝子が補償するためと考えられている。この概念は *Hox* では広く知られ、redundancy (Aubin et al., 1998; Beckers and Duboule, 1998; Horan et al., 1995b)として扱われており、*Hox* 遺伝子群の大部分が当てはまると考えられている。*Hoxc4* 欠損マウスの場合、同じ *Dfd*-type の *Hox* である *a4*, *b4*, *d4* により変異が補償され、その結果 *Hoxc4* 欠損マウスにおける *Mab21l1* の発現パターンは野生型と顕著な差が現れなかったと考えられる。また、多くの *Hox* 変異体では表現系の出現頻度が遺伝子型に完全には一致せず、個体差による Penetrance の問題が知られている (Boulet and Capecchi, 1996; Zakany et al., 1997)。このことから、*Hoxc4* 単独の欠損から *Mab21l1* の発現変化を検出することは困難であると考えられる。これに対し、ショウジョウバエでは *Bithorax Complex* (BX-C) により、直接発現が抑制される標的遺伝子として *sca* (*scabrous*)(Graba et al., 1992) *connectin* (Gould and White, 1992)が報告されている (序論参照)。*sca*, *connectin* は BX-C の null mutant において、異所的に発現が誘導される(Gould and White, 1992; Graba et al., 1992)。マウスが4つのクラスターを持つのに対しショウジョウバエは *Hox* クラスターを1つしか持たず、redundancy の影響が弱いため、単独の変異で標的遺伝子の発現が容易に変化すると考えられる。

マウスにおいて、*Hox* 変異体で発現が変化する標的候補遺伝子は知られるが (Stadler et al., 2001)、いずれも生体内での *Hox* 遺伝子産物による直接的な発現制御の証明には至っていない。生体内で、*Hox* 遺伝子産物が、その近傍ゲノム DNA に対し結合することが示された標的遺伝子は *mgl-1*, SPI3 が知られるが、いずれも、生体内における *Hox* 遺伝子群の役割との関わりは示されていない (Morsi El-Kadi et al., 2002; Tomotsune et al., 1993)。遺伝学的解析から、*Hox* 欠損

マウスで観られる表現型の Penetrance を増強、あるいは抑制することが示された遺伝子は、骨形成自身に直接関わるということが知られる *Pax1* のみである (Aubin et al., 2002)。

友常により染色体免疫沈降法で単離された HOXC4 in vivo 結合配列 (以下 C4B) (Tomotsune, 1994) は *Mab21l1* の ORF の上流約 2 kb に位置する (図 1-9)。岡南によるトランスジェニックマウスを用いた解析から、C4B が *Mab21l1* の発現制御領域を含むことが示唆されている (personal communication, MO)。C4B には *Hox* の in vitro binding consensus 配列 [ATTA または TAAT] は 14 個存在する。この内 *Hoxc4* が属する *Dfd* (*deformed*) の binding consensus 配列 [5'-(C/T)(A/C)ATTA(G/A)-3'] (Ekker et al., 1994) が 3 個含まれる。この 7 塩基からなる配列の出現頻度は 2048 塩基につき 1 個である。したがって 1003 塩基からなる C4B には有意に HOX4 パラログの結合部位が存在すると考えられる。これまでの報告から HOX は cofactor と heterodimer を形成することで、結合配列の認識特異性が上昇し、結合親和力が増加すると考えられている (Chan et al., 1994)。現在までに同定された HOX の cofactor は主に *extradenticle* (*exd*)/*Pbx* (Chan et al., 1994; Di Rocco et al., 1997) *Homothorax* (*hth*)/*Meis* (Casares and Mann, 1998; Shen et al., 1997), *Prep1* (Berthelsen et al., 1998) の 3 種類である。培養細胞を用いたコトランスフェクションの系において、PBX1 存在下で HOXB1 の転写活性の上昇が報告されている (Di Rocco et al., 1997)。また、ジョウジョウバエの生体内でも *Dfd* の転写活性に *exd* が必要であることも報告されている (Shen et al., 1997)。C4B には PBX の binding consensus 配列が 8 個存在し、このことから生体内で HOX4 の標的配列となりうるということが示唆される。特に、図 1-9 に示した 631 番目から 640 番目までの部位には PBX と HOX4 の binding consensus 配列が共に含まれており、PBX-HOX heterodimer の結合部位である可能性が高いと考えられる (Chan and Mann, 1996)。また、C4B に認められる HOX 結合配列が複数存在するという特徴はジョウジョウバエで同定されている UBX 標的配列の特徴 (*dpp*; (Capovilla et al., 1994), *sca*; (Graba et al., 1992)) と一致する。

Mab21l1 は線虫において *Hox* との遺伝学的相互作用が示唆され、かつマウス生体内で *Hoxc4* 遺伝子産物が結合することが示された遺伝子である。加えて本研究により *Mab21l1* 単独の欠損マウスでホメオティック変異が観られ、かつ、*Hoxc4/Mab21l1* 二重欠損マウスでホメオティック変異の penetrance が上昇する

ことから、真の *Hox* 標的遺伝子であると推察された。*Mab2111* の生体内における役割を明らかにすることにより、*Hox* 遺伝子群の役割を解明する上で重要な知見が得られるものと考えられる。しかし、ホメオティック変異の発症作用機序のみならず、肋骨の形成機構に関する知見は限られている。そのような組織で機能未知遺伝子である *Mab2111* の役割を解明することは困難である。そこで、本研究第二章では、形態形成に関する知見が蓄積している眼に焦点をあて、生体内における *Mab2111* の役割を論じる。

***Mab2111* 欠損マウスにおける包皮腺形成異常と不妊性**

マウス包皮腺は E16 以降で形成が始まり、出生後 2 週間から生後 2 ヶ月の間に発達することが知られている (Rudali et al., 1974)。雌雄共に、新生仔の包皮腺源基に *Mab2111* は発現するが、*Mab2112* は発現しない。このため、包皮腺では *Mab2111* の欠損が *Mab2112* で補償されず、成体雄 *Mab2111*-/-マウスにおいて包皮腺の形成異常起こると考えられる。成体雌の包皮腺は解剖学的に認識が困難であるため、*Mab2111*-/-における形成異常は未確認である。*Mab2111*-/-マウスは雄、雌、共に自然交配では不妊性を示した。これに対し、試験管内受精の結果から、雄、雌共に生殖細胞は正常であることが判明した (二章参照)。このことから、*Mab2111*-/-における不妊性は包皮腺の形成不全に起因すると考えられた。*Mab2111*-/-は眼形成異常から盲目であると推測されるが、*aphakia* 突然変異マウスは盲目でも正常に自然交配を行うことが知られている (Semina et al., 1997)。よって、盲目と不妊性は関連しないと判断した。

spdh マウスは *Hoxd13* に突然変異をもつ自然突然変異体であり、ホモ接合体の雄は包皮腺の完全な欠落とともに不妊性を示すことが知られている (Johnson et al., 1998)。一方、雌の *spdh* ホモ接合体は包皮腺の欠落にも関わらず、正常な妊性を示す。*spdh* マウスの不妊性に観られる雌雄差は、雌の妊性が包皮腺に非依存的事であることを示唆している。これに対し、*Mab2111*-/-マウスは包皮腺が残存しているにも関わらず、雌雄共に不妊性を示す。このことは *Mab2111*-/-マウスの不妊性は包皮腺形成不全以外の要因を含むことを示唆する。

Mab2111-/-は以下の理由により、性行動障害を起こすことが推測される。第一に雄の包皮腺は雌の発情を誘発するフェロモン刺激に必要不可欠であることが知られていること (Bronson and Caroom, 1971; Chipman and Albrecht, 1974)。第

二に中枢神経系における *Mab21l1* 転写産物の発現は繁殖行動との関連が知られる鋤鼻嗅覚神経系(Vomeronasal system, VNS)の投射経路に特異的に発現していること。鋤鼻器官は受容体を介してフェロモン刺激を感知する器官であることが知られている(Halpern, 1987)。一方 *Mab21l2* は視床を除き、VNS には発現しない。*Mab21l1*-/-の VNS において組織学的異常は検出されていないが、*Mab21l1* が特異的に発現することから、*Mab21l1* 欠損により何らかの異常が引き起こされ、結果として性行動障害が起きる可能性が示唆される。

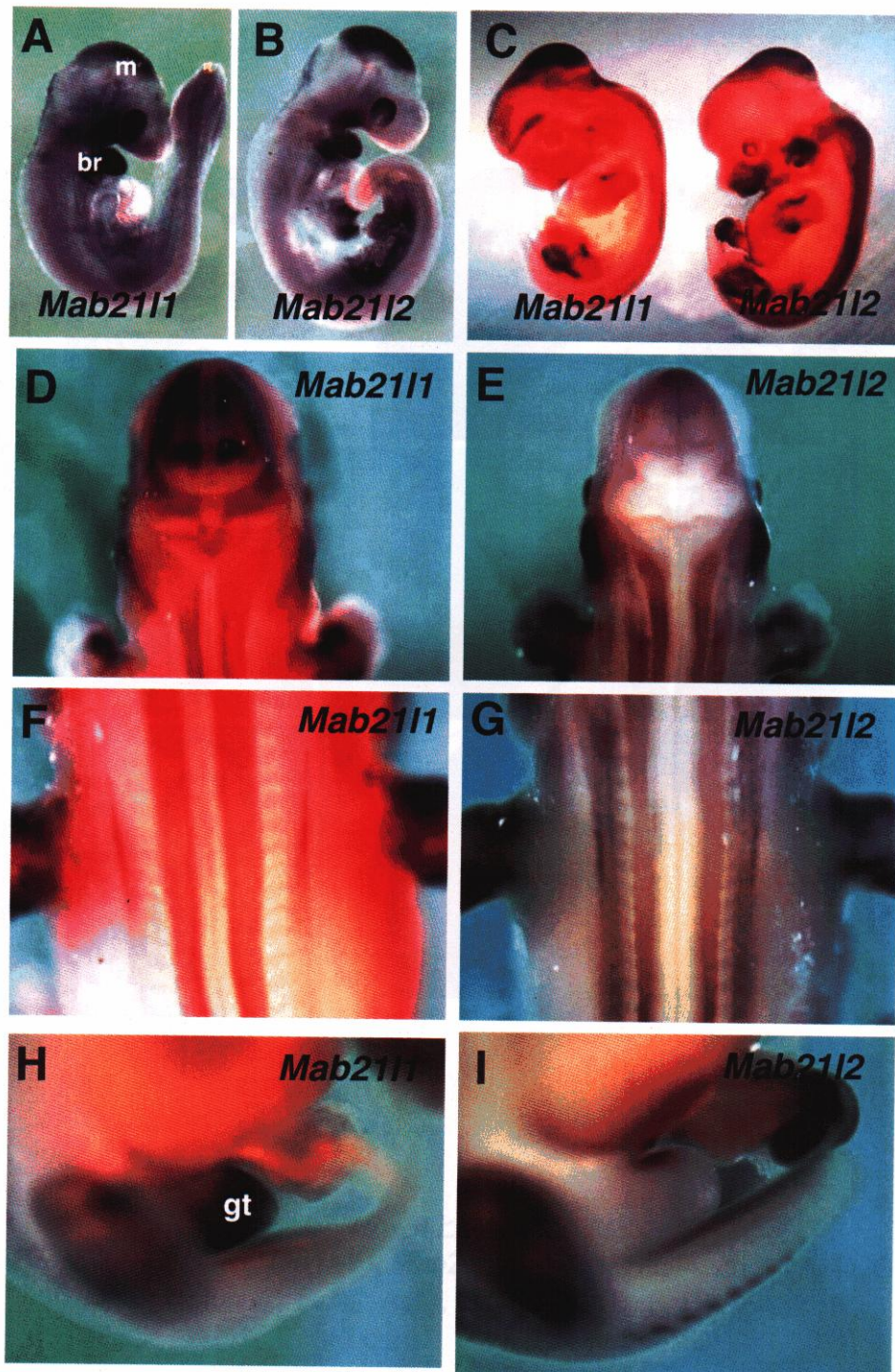


図1—1 *Mab21l1/Mab21l2*転写産物の発現パターン
 E9.5 (A, B)、E12.5(C-I)のwhole mount in situ hybridization。 *Mab21l1*
 (A, C左、D, F, H), *Mab21l2*(B, C右、E, G, I)。 b, 鰓弓; m, 中脳; gt, 生
 殖結節

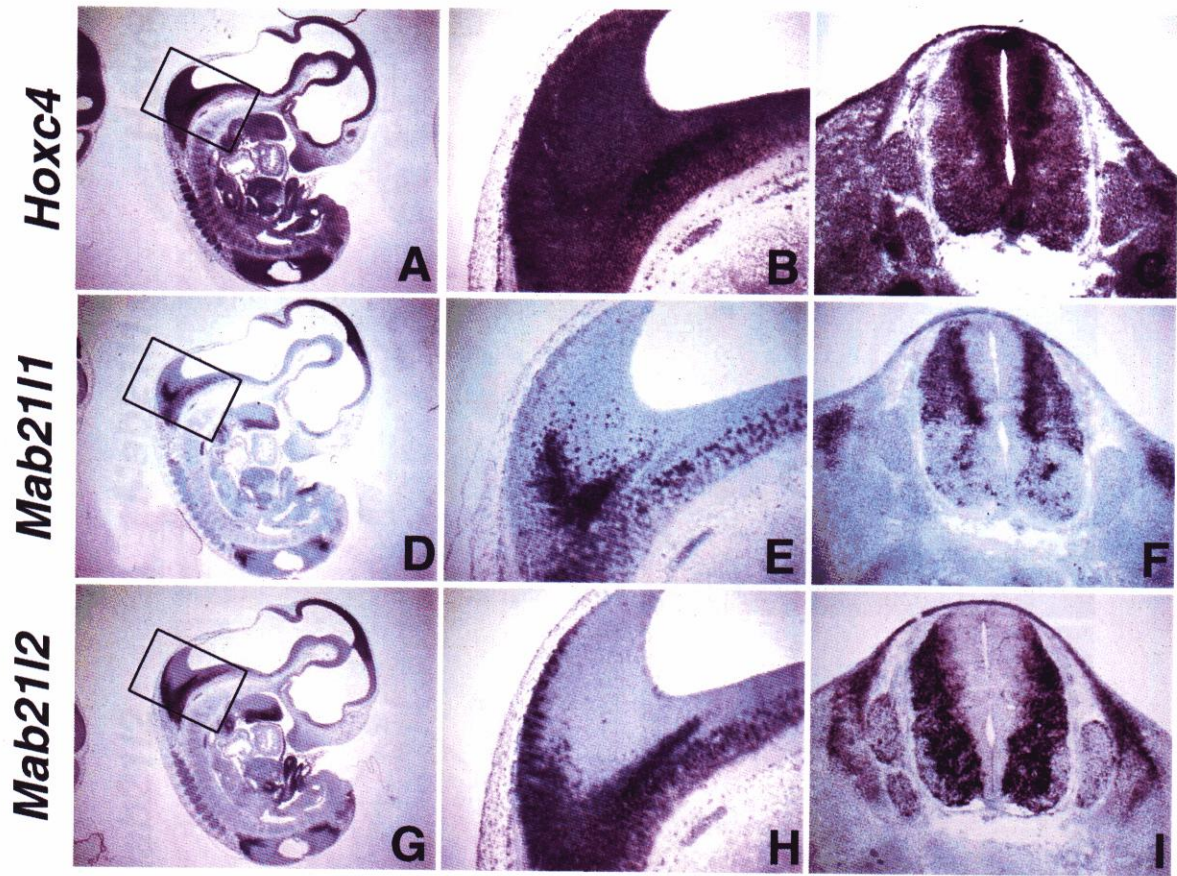


図1—2 E11.5における*Hoxc4*と*Mab21l1*, *Mab21l2*の発現パターン
Hoxc4(A-C), *Mab21l1*(D-F), *Mab21l2*(G-I)。sagittal section (A, D, G),
horizontal section (C, F, I)。A, D, Gの拡大図(B, E, H)。

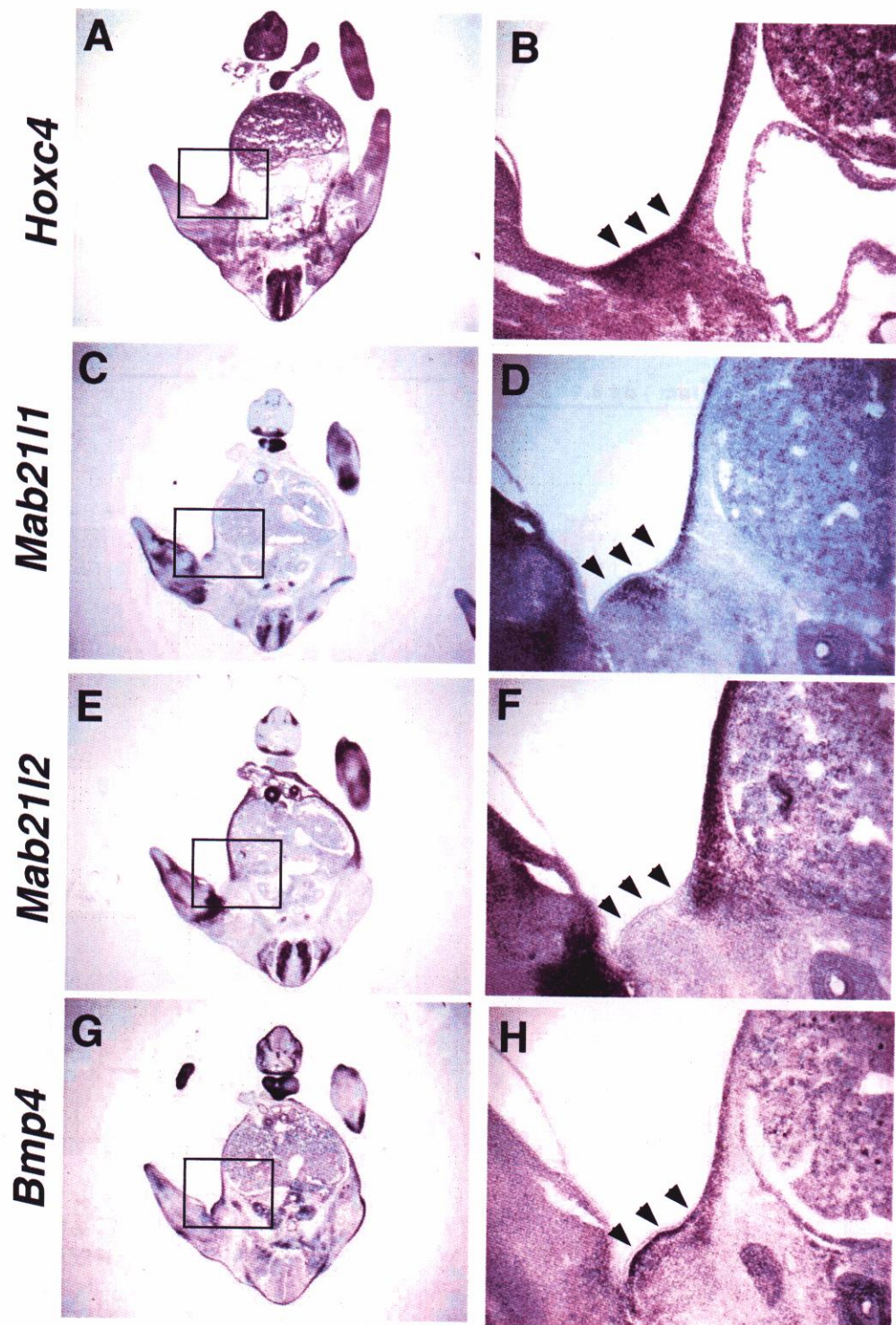
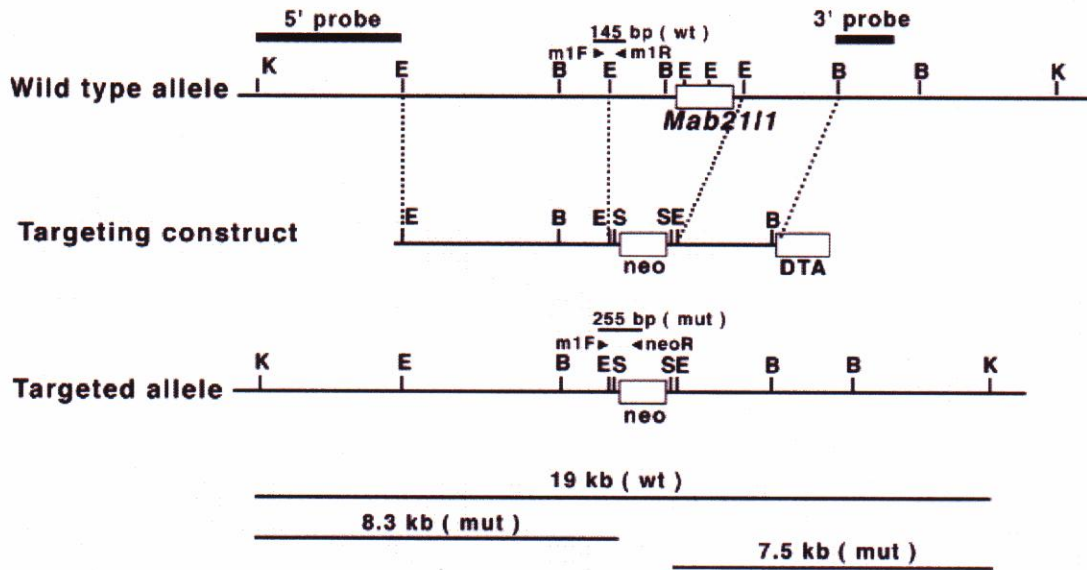
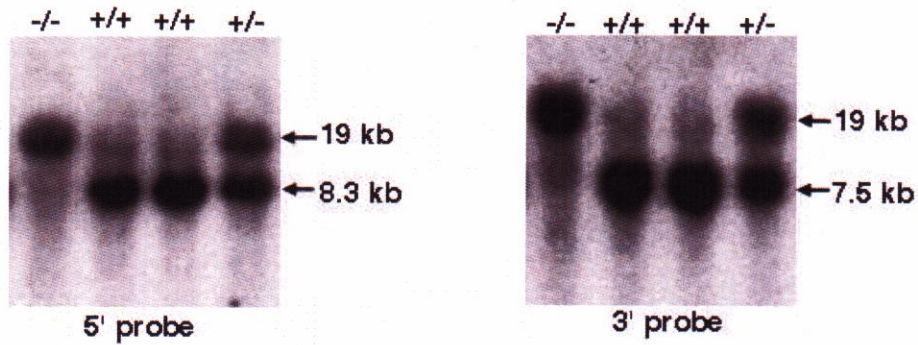


図1—3 E11.5腹側体壁における*Hoxc4*, *Mab21l1/2*, *Bmp4*の発現パターン
Hoxc4(A, B), *Mab21l1*(C, D), *Mab21l2*(E, F), *Bmp4*(G, H)A, C, E, G, の拡大図
(B, D, F, H)。腹側体壁の間充織において、*Hoxc4*, *Mab21l1*, *Bmp4*の発現は重
複した(矢印)。

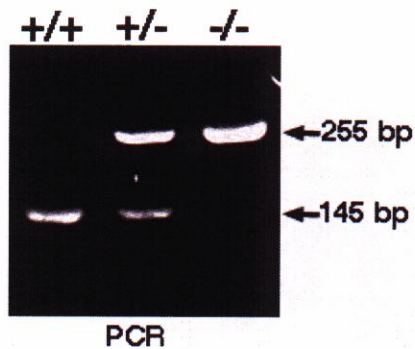
A



B



C



D

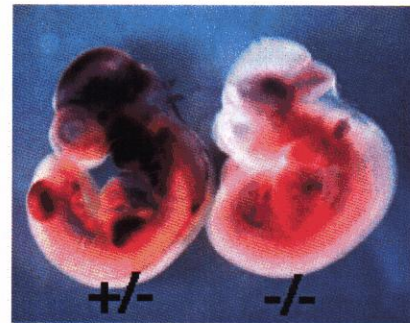


図1—4 *Mab21l1*欠損マウスの作製

(A)野生型*Mab21l1*ゲノム、とターゲッティングベクター、遺伝子欠損型ゲノムの制限酵素地図。(B)サザンブロットによるGenotyping。(左) *KpnI*,*SalI*処理後のサンプルを5'側プローブで検出したもの。野生型は8 kb, 欠損型は19 kbのバンドとして検出された。(右) *KpnI*,*SalI*処理後のサンプルを3'側プローブで検出したもの。野生型は7.5 kb, 欠損型は19 kbのバンドとして検出された。(C)PCRによるGenotyping。野生型は145 bp, 欠損型は225 bpのバンドとして検出された。(D)*Mab21l1*のwhole mount in situ hybridization。E10.5 *Mab21l1*^{-/-}胚ではシグナルが検出されなかった。

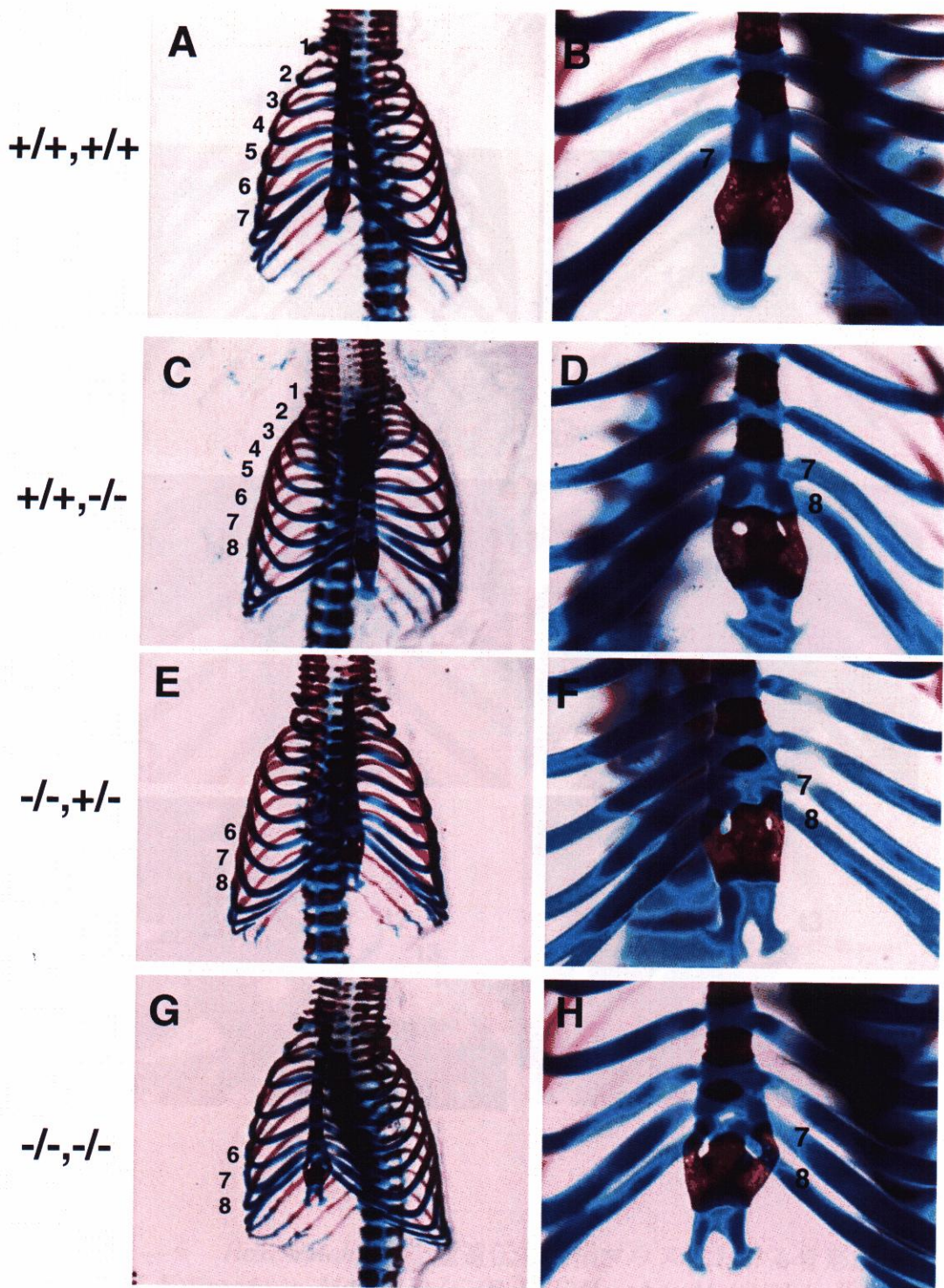


図1—5 *Hoxc4/Mab2111*二重遺伝し欠損マウスにおける骨形成異常 (A, B)*Hoxc4*^{+/+}, *Mab2111*^{+/+}, (C, D)*Hoxc4*^{+/+}, *Mab2111*^{-/-}, (E, F)*Hoxc4*^{-/-}, *Mab2111*^{+/+}, (G, H)*Hoxc4*^{-/-}, *Mab2111*^{-/-}新生仔の骨染色。胸骨に結合する肋骨は野生型では7本だが、欠損マウスでは8本であった。また、Xiphoid processに穴が認められた(矢印)。

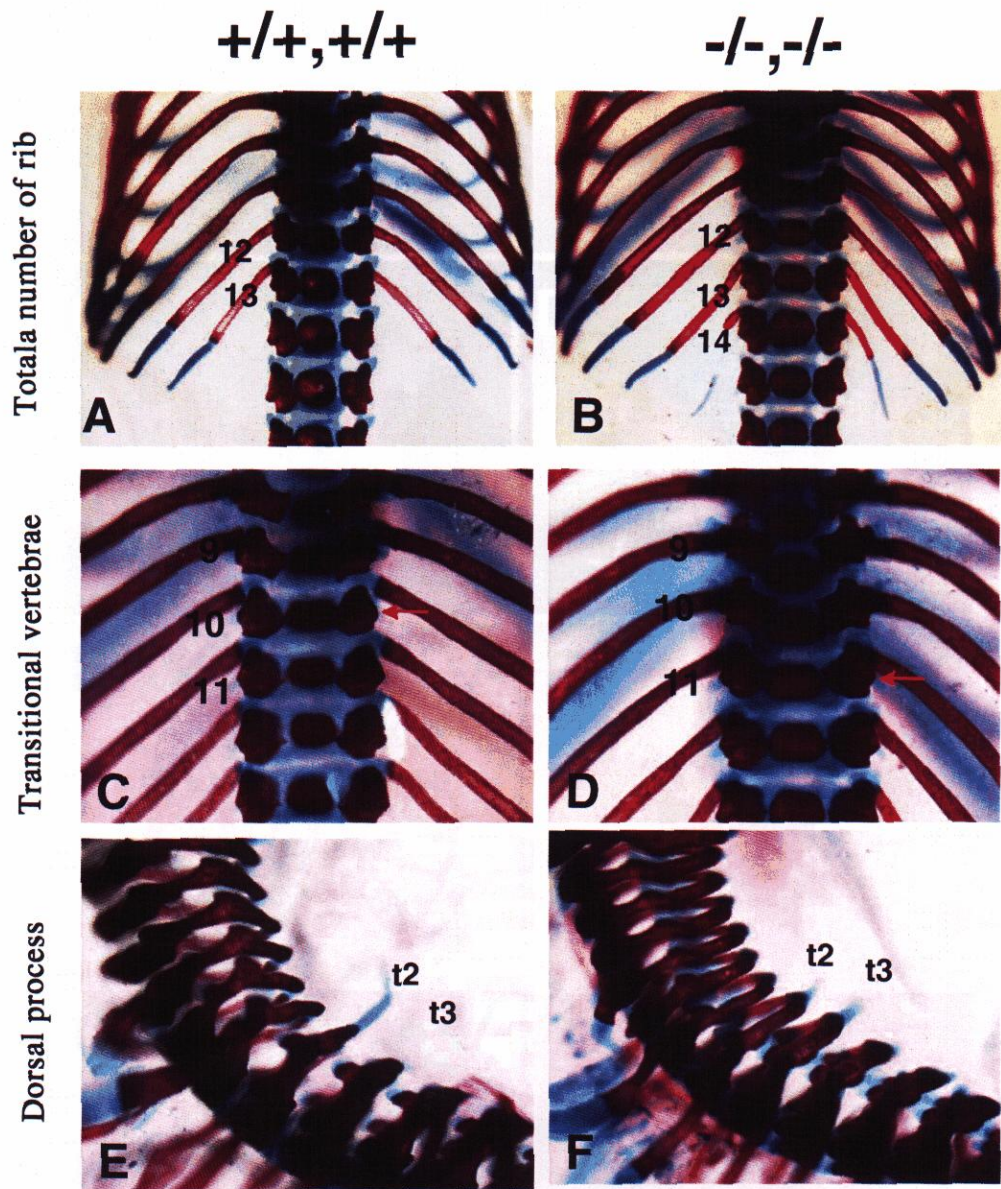


図 1—6 *Hoxc4/Mab2111* 二重遺伝し欠損マウスにおける骨形成異常 (A, C, E) *Hoxc4*^{+/+}, *Mab2111*^{+/+}, (B, D, F) *Hoxc4*^{-/-}, *Mab2111*^{-/-} 新生仔の骨染色。野生型では肋骨は 13 本だが、欠損型では 14 本であった。また、Transitional vertebrae は 11 番目の胸部脊椎に認められた。Dorsal process が二番目の胸部脊椎よりも 3 番目の方が大きかった。

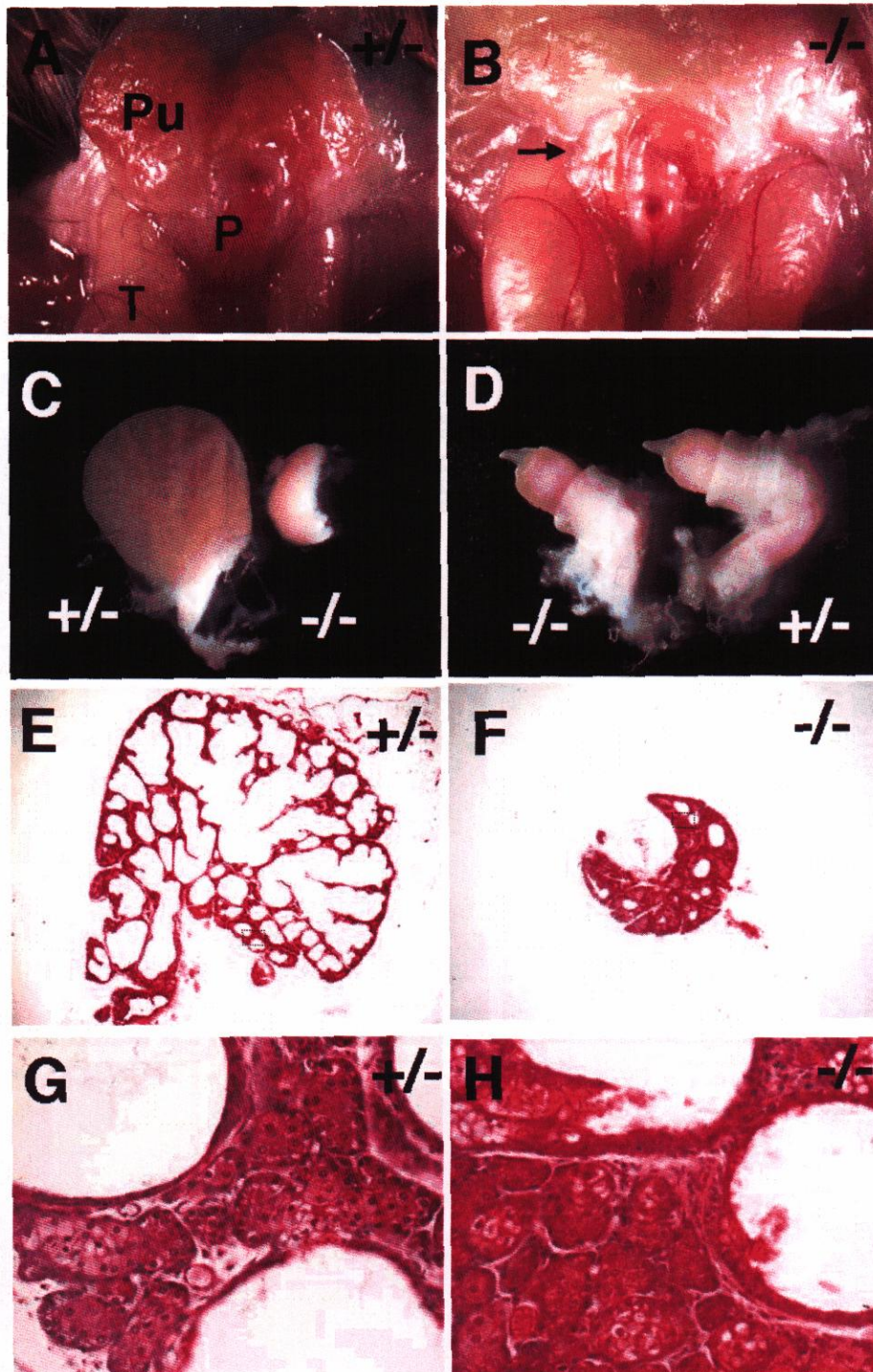


図1—7 *Mab21l1*欠損マウスにおける包皮腺形成異常
 (A) *Mab21l1*^{+/+} (B) *Mab21l1*^{-/-} 成体雄マウスの外生殖器。
Mab21l1^{-/-}では包皮腺形成異常が認められた(矢印)。Pu, 包皮腺; P, ペニス; T, 精巣。(C) 摘出された包皮腺 (左) *Mab21l1*^{+/+} (右) *Mab21l1*^{-/-}。(D) 摘出されたペニス (右) *Mab21l1*^{+/+} (左) *Mab21l1*^{-/-}。(E-H) 包皮腺の組織切片のHE染色像。(E) *Mab21l1*^{+/+} (F) *Mab21l1*^{-/-} (G) Eの拡大図 (H) Fの拡大図。

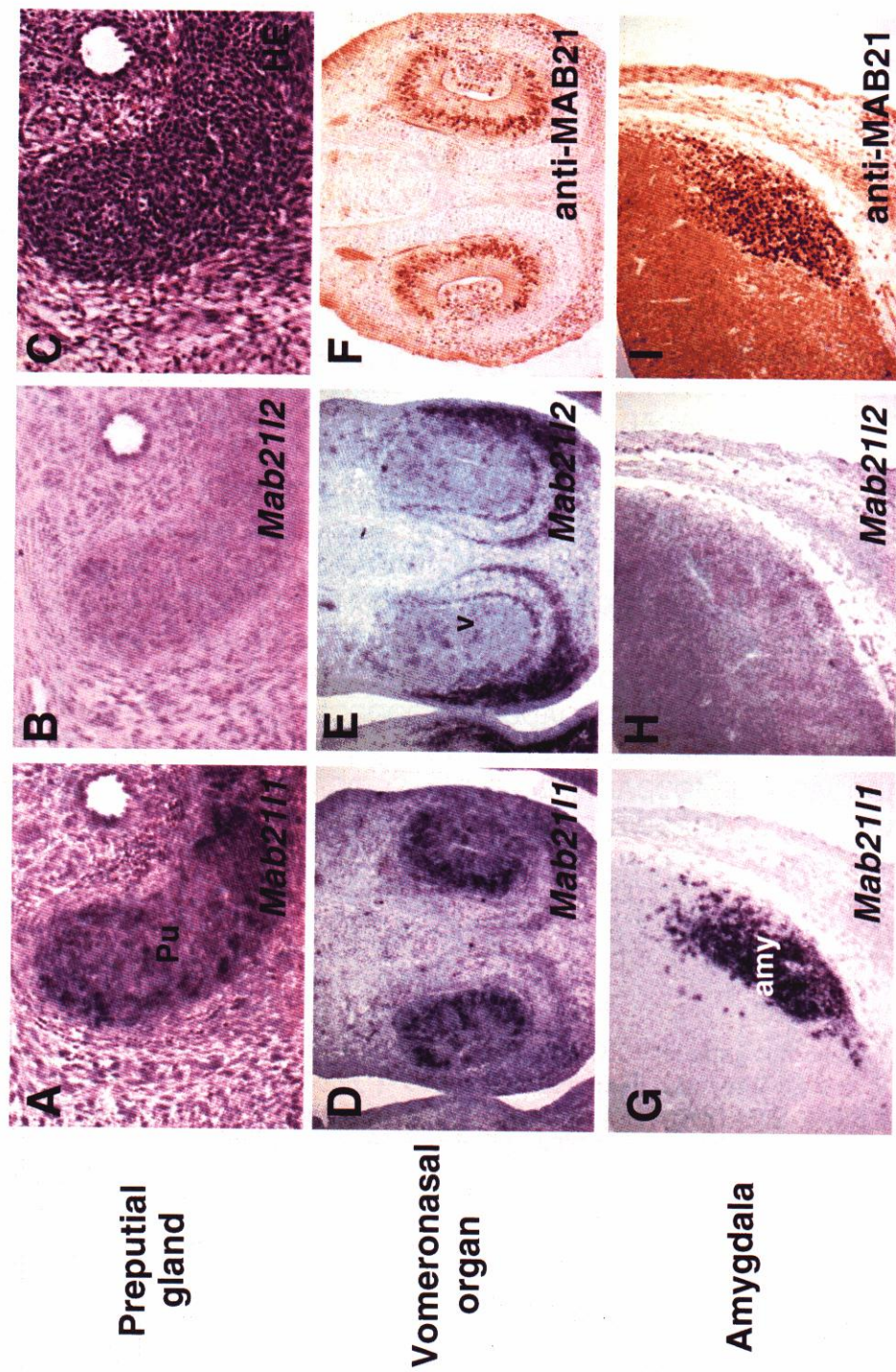
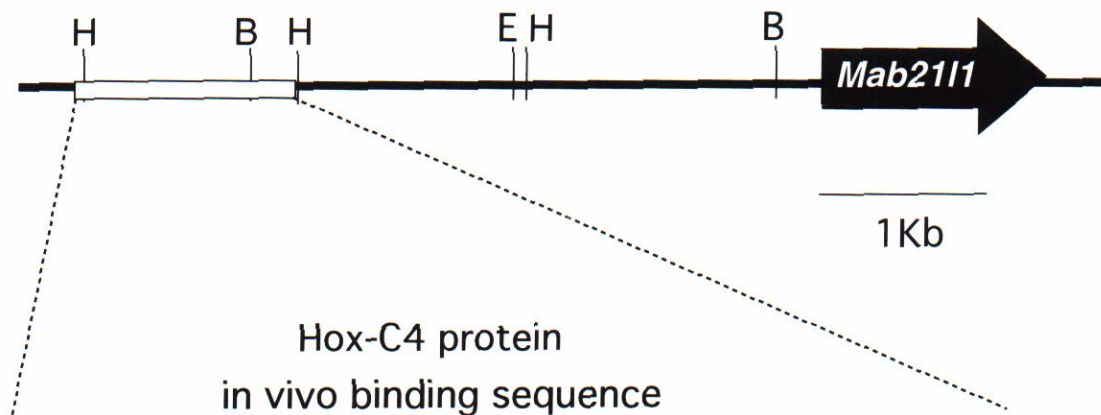


図1—8 包皮腺、および鋤鼻嗅覚神経系におけるMab2111の発現 (A-C)生後1日目新生仔包皮腺のhorizontal切片。(D-F)E15鋤鼻器官のcoronal切片 (G-I)E13扁桃体周辺のcoronal切片。(A, D, G) Mab2111 in situ hybridization。(B, E, H) Mab2112 in situ hybridization。(C)HE染色像。(F, I)抗MAB21抗体による免疫組織染色像 (抗体に関しては第四章参照)。Pu, 包皮腺; V 鋤鼻器官; Amy, 扁桃体



Hox-C4 protein
in vivo binding sequence

```

AAGCTTTTCTTCTGGTACTCGGTAAGACTGTATTTTAAAAATTGCTAGC
GTC AATTCAATTCTTACATA TAATAAAACAGACTTTAT ATTACATTGTGT 100
ATCAATCAGCAGTTCAAACAATCCAATGGGTCATTTTTTTAAAAATTA
AAATTACTATCAAGTAGTTAAATAATTTACCGGTATACGAGATATCTAAC 200
GCCAAAACCTTCGATTAAAAATCAGGTGAATTACACAAAATACATCATTAA
TTTTAATTCCTCTCCATGGACAATTCAATTAAGTAAGCACGGAAGGAAG 300
CAGTCATCAGTGCGGTTTAGTTTTTCTTCAACAAGGAGAGGTGCTGAG AT
TATGGAAAGGATTCAGCTACAGGCACAATTCATTTCTCGGACTACGGGTA
GCGGGTAGCGGACGATCTGGGTAGCAGCAGCTAGAGAGACAATCTAACGT
TATTCTAAGCCTCCAGTCAACCCACAGGGACAGCAGCCGCCAGTGTCC 500
GGTTTTATGTAAATCACTGTCTGGCTCCGGGCGTGGAGGGTGCTTCAGGAC
GCTGGCCAGCCTGGCCCACAACACTCTAGTTTTCTTAGTCCTCTTGCTCCA
AGCGAAAATCGTTTCGGAAAAGGCCTCAGTTGCATCAATTAGTTTGCGCAG
AATGCTTCGGTGTTTAGCTTCGCCTTAACCCCAATTAAGCCGCACAGCGAG 700
CCCAGAAAGATGCGCCACCTGCGCCTGGCTGCAGTCGGCGGCCGCGGGAT
CCTGAGTCCTTCTGTTGGACTGAGGGAACCAAGGCCTCGGCGTCGAAGCT
ACATCGAGTCCCATAGTCCGGGGTGAGGCACGGGGCGCGCTCACCCGG
GAAGGTGAGGGCCAAGTATTCCTGGGTGTTCTGAGTACAGCACACGCTTG 900
GCTGGGGCCATTCGAGGGCGGGCAGGCGATGAGAGCGAAGGGCACCGAGA
GTGTTTTGCAGCGATGGATGTGAGTGGGGGTCATCCAGACACCCAGAA AG 1000
CTT 1003

```

図1-9 HOXC4 in vivo 結合配列。
序論図2のHindIII-HindIII断片1003bpの配列。HOXのbinding consensus配列である**ATTA**または**TAAT**を太字で示した。*Deformed* (*Hoxc4*のショウジョウバエortholog)のbinding consensus配列である5'-**CAATTA**(A/G)-3'を■で示した。Pbx-1のbinding consensus配列である5'-**ATCA**-3'を太字と下線で示した。AAGCTT, HindIII site

New born

genotype	n	ratio	supeculative ratio
c4+/+, mab1+/+	30	8.80%	6.25%
c4+/-, mab1+/+	46	13.49%	12.50%
c4+/+, mab1+/-	48	14.08%	12.50%
c4+/-, mab1+/-	97	28.45%	25.00%
c4-/-, mab1+/+	19	5.57%	6.25%
c4+/+, mab1-/-	21	6.16%	6.25%
c4-/-, mab1+/-	32	9.38%	12.50%
c4+/-, mab1-/-	32	9.38%	12.50%
c4-/-, mab1-/-	17	4.99%	6.25%
合計	342		

1 month

genotype	n	ratio	supeculative ratio
c4+/+, mab1+/+	12	11.88%	6.25%
c4+/-, mab1+/+	17	16.83%	12.50%
c4+/+, mab1+/-	9	8.91%	12.50%
c4+/-, mab1+/-	25	24.75%	25.00%
c4-/-, mab1+/+	7	6.93%	6.25%
c4+/+, mab1-/-	4	3.96%	6.25%
c4-/-, mab1+/-	12	11.88%	12.50%
c4+/-, mab1-/-	11	10.89%	12.50%
c4-/-, mab1-/-	4	3.96%	6.25%
合計	101		

表1-1 *Hoxc4/Mab2111* 二重欠損マウスの生存率

Phenotype	n	8th rib at sternum				malformed xiphoid process		14th rib on L1	
		total		one side		3	10%	0	0%
		both side	one side	both side	one side				
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	30	1	3%	0	0%	1	3%	0	0%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	46	10	22%	5	11%	5	11%	5	11%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	48	2	4%	1	2%	1	2%	2	4%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	97	23	24%	18	19%	5	5%	9	9%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	19	11	58%	6	32%	5	26%	1	5%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	21	4	19%	4	19%	0	0%	2	10%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	32	24	75%	18	56%	6	19%	7	22%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	32	15	47%	11	34%	4	13%	8	25%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	17	12	71%	9	53%	3	18%	6	35%

Phenotype	n	dorsal process				Transitional vertebrae							
		12>13		12=13		t10 (intermediate)		t11					
		12>13	12=13	12<13	19 (intermediate)	t10	t10 (intermediate)	t11					
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	30	28	93%	2	7%	0	0%	25	83%	2	7%	1	3%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	46	30	65%	13	28%	3	7%	32	70%	11	24%	3	7%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	48	48	100%	0	0%	0	0%	30	63%	5	10%	2	4%
<i>Hoxc4</i> ^{+/+} , <i>Mab21111</i> ^{+/+}	97	72	74%	20	21%	5	5%	61	63%	30	31%	6	6%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	19	0	0%	12	63%	7	37%	7	37%	6	32%	6	32%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	21	21	100%	0	0%	0	0%	15	71%	4	19%	2	10%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	32	4	13%	17	53%	11	34%	12	38%	9	28%	11	34%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	32	29	91%	3	9%	0	0%	8	25%	16	50%	8	25%
<i>Hoxc4</i> ^{-/-} , <i>Mab21111</i> ^{-/-}	17	0	0%	10	59%	7	41%	2	12%	5	29%	10	59%

表 1-2 *Hoxc4/Mab2111* 二重欠損マウスにおける骨形成パターン異常の割合

相乗的相互作用のあるものを太字で示した。

第二章

水晶体形成過程における *Mab21l1* の役割

2—1 序

哺乳類の眼は、眼胞と頭部外胚葉から生じる（図2—1）。眼胞の外側領域が頭部外胚葉に接し、水晶体プラコードが誘導され、頭部外胚葉の肥厚と陥入が起り水晶体胞が形成される。水晶体胞の形成に伴い眼胞から眼杯と呼ばれる構造が形成される。眼杯は3種類の組織から構成される。眼杯中央部分からは後に神経性網膜が形成され、遍遠部からは網膜色素上皮細胞層、基部からは眼柄が形成され、眼柄は後に視神経束を形成する。anterior margin と呼ばれる眼杯の遍遠部から、虹彩と毛様体が生じる。角膜は水晶体胞分離後の頭部外胚葉と神経堤由来の細胞から生じる。マウスでは胎生17日までに、これら眼の源基がすべて形成される(Chow and Lang, 2001; Kondo H, 2002)。

水晶体の誘導は、ニワトリや両生類の組織片移植を主とする伝統的発生生物学的手法により古くから研究され、多くの知見が得られてきた(Spemmann, 1901; Lewis, 1904; Grainger, 1992)。加えて、ノックアウトマウスや自然変異体の解析、遺伝子導入技術の発達により、種々の転写調節因子が水晶体形成過程で重要な役割を持つことが明らかにされている(Ashery-Padan and Gruss, 2001; Chow and Lang, 2001; Hirsch and Grainger, 2000; Kondoh, 1999)。Pax6 は、その変異体(*Small eye*, [*Sey*])で眼が欠損することが知られ、眼の発生過程で中心的な役割を担っていると考えられている(Ashery-Padan and Gruss, 2001; Grindley et al., 1995)。Pax6 は頭部外胚葉と眼胞両方に発現するが、頭部外胚葉において Pax6 が細胞自律的な役割を持つことが組織片移植実験、およびキメラマウスの解析から明らかにされている(Collinson et al., 2000; Fujiwara et al., 1994; Quinn et al., 1996)。Sox2 は誘導刺激を受けて水晶体プラコード形成と同時に発現量が上昇することが知られ、Pax6 と協調的に働き δ -crystallin の発現制御することが示されている。水晶体プラコードで発現が維持される Pax6, Six3, Sox2/Sox3 に加え、水晶体プラコード形成後に発現が開始する c-maf, Prox1 はいずれも crystallin 遺伝子を発現制御することが知られ、水晶体分化過程で重要な役割を持つことが示唆されている(Kamachi et al., 2001; Lengler et al., 2001; Yoshida and Yasuda, 2002)。crystallin は可溶性タンパク質であり、水晶体の透明化に必要であると考えられている(Brady et al., 1997)。

Mab2111 は眼源基で発現することが本研究第一章で示され、また、Mab2111-/-

マウスは眼形成異常を示すことが見い出された。眼は、形態形成機構が最も良く研究されている器官の一つであり、多くの遺伝学的知見、分子生物学的知見が蓄積している。したがって、*Mab2111*^{-/-}の眼形成異常と既知の眼形成に関する知見を比較することで、機能未知遺伝子である *Mab2111* の役割が検討可能であると考えられる。そこで、本章では *Mab2111* の眼形成過程における役割を明らかにすることで、生体内における *Mab2111* の役割を解明することを目的とした。

2-2 結果

成体 *Mab2111* 欠損マウスにおける眼形成異常

全ての成体 *Mab2111* 欠損マウスにおいて、眼形成異常が認められた (図 2—2B)。*MAB2111*^{-/-} の眼は野生型にくらべ著しく小さかった。組織学的解析から、虹彩、毛様体の消失、および水晶体様組織の痕跡が認められた (図 2—2b)。また、前眼房は形成されず、予定前眼房領域には網膜色素細胞の浸潤が認められた。角膜において、上皮、間充織の明確な境界は認められなかった (図 2—2b)。一方、視神経束、および網膜色素細胞層は認められた (図 2—2E)。また、形態的判断から、神経性網膜を構成する主な層構造である、光受容細胞層 (杆状体視細胞と錐状体視細胞)、統合双極細胞層 (水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞) 視神経細胞層等が認められた (図 2—2d)。

Mab2111 は水晶体の発生に重要な役割を果たす

Mab2111^{-/-} は E12.5 においては網膜色素上皮の形態異常から、眼形成異常が容易に識別できた。E10.5 においては、その外観から眼形成異常は観られなかった (図 2—3B)。E16 において、水晶体は認められず、組織学的解析から、E17 において水晶体の消失、および角膜と網膜の異常な膨潤が認められた (図 2—3B, D)。E13 において、すでに水晶体の消失が認められたが、予定角膜領域、および神経性網膜細胞の層構造に異常は観られなかった (図 2—3F)。E10.5 において、水晶体胞は形成されず、形成不全の水晶体プラコードが認められた (図 2—3H)。E9.5 において、予定水晶体プラコード領域の肥厚に、弱冠の異常が認められた (図 2—3J)。E9.0 以前の胎仔では、顕著な形態的異常は認識できなかった。以上の結果から、*Mab2111* が水晶体形成において重要な役割を果たすことが明かとなった。

Mab2111^{-/-} における水晶体形成異常を詳細に理解するために、遺伝子マーカーを用いて、in situ hybridization を行った。*αA-crystallin* はマウス水晶体形成過程で最も初期に発現する水晶体特異的遺伝子であることが知られている (van Leen et al., 1987; Wistow and Piatigorsky, 1988)。E10.5 において、*αA-crystallin* は野生型の水晶体胞で発現が観られたが、*Mab2111*^{-/-} では発現が認められなかつ

た (data not shown)。E12.5 において、 αA -*crystallin* は野生型の水晶体繊維細胞で強く発現し、錐体上皮細胞でも弱い発現が認められた (図 2—4 A)。*Mab2111*^{-/-}では、その発現領域に著しい減少が観られたが、水晶体様痕跡組織に弱い発現が認められた (図 2—4 B)。 γA -*crystallin* は野生型では水晶体繊維細胞に限局して発現が観られた (図 2—4 D) (Goring et al., 1992; van Leen et al., 1987)。*Mab2111*^{-/-}では水晶体痕跡組織に弱い発現が認められた。微量ながら、*crystallin* の発現が認められたことから、*Mab2111*^{-/-}において、水晶体繊維細胞の分化は起こっていると考えられた。この時期の水晶体において、野生型では水晶体上皮細胞と水晶体繊維細胞は容易に識別可能であった。しかしながら、*Mab2111*^{-/-}水晶体痕跡組織において、水晶体上皮細胞と水晶体繊維細胞は形態的に識別出来なかった。

次に、*Mab2111*^{-/-}の網膜分化過程に対する影響を調べるために、神経性網膜形成関連遺伝子の発現を *in situ hybridization* で調べた。*Chx10* と *Brn3B* は共に、神経性網膜の発生に重要な役割を持つ遺伝子であることが知られている (Burmeister et al., 1996; Ferda Percin et al., 2000; Gan et al., 1996; Liu et al., 1994; Liu et al., 2000; Turner et al., 1994)。E12.5, E15 いずれにおいても、野生型と *Mab2111*^{-/-} で *Chx10*, *Brn3B* の発現に差は観られなかった (図 2—4 E-H)。さらに、網膜発生過程において *Mab2111* と発現パターンが類似している遺伝子である、*Rx*, *Sox2*, *Otx2*, *Six3*, *Hes1*, *Pax6*, *Lhx2* (Furukawa et al., 1997; Kamachi et al., 1998; Matsuo et al., 1995; Oliver et al., 1995; Sasai et al., 1992; Walther and Gruss, 1991; Xu et al., 1993) に関しても *in situ hybridization* を行ったところ、*Mab2111*^{-/-} で顕著な変化は認められなかった (data not shown)。

眼の発生過程における、*Mab2111* と *Mab2112* の発現

Mab2111 と *Mab2112* は共に、眼の源基で発現することが、筆者と他の研究者の報告により明らかにされた (Mariani et al., 1999; Mariani et al., 1998; Wong et al., 1999)。*Mab2111*^{-/-}の水晶体形成異常を理解するために、発生過程の眼に焦点を当て、*Mab2111* と *Mab2112* の発現を比較した。15 体節期 (E8.5-9.0) において、*Mab2111* は予定水晶体プラコード領域付近の外胚葉と眼胞に弱く発現していた (図 2—5 A)。この時期に *Mab2112* は背側眼胞に限局して発現が観られた (図 2—5 B)。24 体節期 (E9.5) において、*Mab2111* の発現は外胚葉、眼胞

共に増加していた。外胚葉における *Mab2111* の発現は予定水晶体プラコード領域よりも広い領域に発現していた (図 2—5 C)。これに対し、*Mab2112* は背側眼胞に発現がさらに限局し、外胚葉には全く発現が観られなかった (図 2—5 D)。30 体節期 (E10) において、水晶体プラコードはすでに形成され、陥入が起こる。この時期、外胚葉における *Mab2111* の発現は水晶体プラコードに限局して認められた (図 2—5 E)。一方、眼杯において、*Mab2111* と *Mab2112* は共に予定神経性網膜と予定網膜色素上皮に発現していた (図 2—5 E, F)。E12 において、*Mab2111* と *Mab2112* は神経性網膜と網膜色素上皮に共発現していたが、*Mab2111* は水晶体上皮細胞に、*Mab2112* は視神経束に特異的に発現していた (図 2—5 G, H)。

水晶体プラコード形成における、*Mab2111* の重要性

Mab2111^{-/-}マウスにおいて、*crystallin* 陽性の水晶体様組織が認められた。このことから、*Mab2111*^{-/-}における水晶体形成異常は、水晶体源基の生長不全によるものと考えられた。そこで、*Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}の水晶体細胞の増殖を BrdU を用いて解析した。BrdU は DNA 複製期 (S 期) の細胞に取り込まれるため、BrdU を検出することで、増殖中の細胞を識別できる。水晶体プラコード形成初期の 27 体節期 (E9) において、*Mab2111*^{+/-} と *Mab2111*^{-/-} の BrdU 取り込み効率に顕著な差は観られなかった (図 2—6 A, B)。30 体節期において、*Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}に形態的な差は観られなかったが、*Mab2111*^{-/-}の水晶体プラコードで、BrdU 陽性細胞の減少が認められた (図 2—6 D)。32 体節期において、*Mab2111*^{-/-}の水晶体プラコードは陥入が停止し、水晶体胞の形成不全が認められた。また、BrdU の取り込みは減少していた (図 2—6 F)。35 体節期において、*Mab2111*^{-/-}の水晶体プラコードは依然として不完全な状態で陥入が停止しており、この領域で、BrdU の取り込みはほとんど観られなかった (図 2—6 H)。水晶体細胞における BrdU 陽性細胞数を定量化した結果を図 2—7 に示した。t 検定の結果、計測した全ての発生段階で、*Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}の BrdU 取り込み効率に有意差があることが判明した。水晶体の生長不全に対する、細胞死の関連を検討するために、TUNEL 法を用いて細胞死を検出した。その結果、35 体節期において、*Mab2111*^{-/-}の形態異常を起こした水晶体プラコードで、TUNEL 陽性細胞の増加が認められた (図 2—6 J)。

27体節期から、40体節期にかけて、35体節期以外の発生段階では TUNEL 陽性細胞数に *Mab2111*^{+/-} と *Mab2111*^{-/-} に顕著な差は観られなかった(data not shown)。

以上の結果から、*Mab2111* が水晶体プラコードの形成過程で、細胞増殖に関連する役割を持つことが判明した。

MAB21L1 は水晶体形成過程において細胞自律的に働く

脊椎動物の水晶体は眼杯からの誘導を受けた外胚葉から発生することが知られている(Grainger, 1992)。*Mab2111* は水晶体プラコードのみならず、眼杯にも発現が認められた(図2-6)。したがって、*Mab2111*^{-/-}マウスで観られた水晶体形成不全が、水晶体プラコードの異常によるものか、眼杯の異常に由来するものかは判断できない。水晶体形成過程における、*Mab2111* の役割を検討するために、*Mab2111*^{-/-}細胞と野生型細胞から構成されるキメラマウスを作製した。*Mab2111*^{-/-}マウスは不妊性を示したため、*Mab2111*^{-/-}胎仔は試験管内受精により得た。*Mab2111*^{-/-}胎仔と、 β -galactosidase トランスジーンをもつ ROSA26 系統(Zambrowicz et al., 1997)の野生型胎仔を8細胞期同士で混合し、仮親の子宮に移植した。発生段階が E12.5 に相当する時期にキメラマウスを摘出し、 β -galactosidase の活性を X-gal を用いて染色した。染色後の胎仔で切片を作製し、 β -galactosidase 陽性細胞の組織分布を観察した。その結果、コントロールの *Mab2111*^{+/+}キメラマウスにおいて、 β -galactosidase 陰性細胞が、水晶体上皮に認められた(図2-8a)。作製した24匹の *Mab2111*^{-/-}キメラマウスの内、13匹は β -galactosidase 陰性細胞、すなわち *Mab2111*^{-/-}細胞がほとんど含まれておらず、形態的異常は観られなかった(data not shown)。*Mab2111*^{-/-}細胞を全細胞の約半数含む *Mab2111*^{-/-}キメラマウスは7匹得られた。これらのキメラマウスは全て、水晶体の大きさが野生型のコントロールに比べて小さかった(図2-8B', C')。さらに、これらの *Mab2111*^{-/-}キメラマウス水晶体において、 β -galactosidase 陰性細胞は全く観られなかった(図2-8b, c)。一方、網膜や角膜、眼の周辺の間充織においては、コントロールの野生型キメラマウスと同様に、 β -galactosidase 陰性細胞が認められた(図2-8b, c)。*Mab2111*^{-/-}細胞が全域を占めるキメラマウスは4匹得られ、*Mab2111*^{-/-}マウスと同様に、水晶体の形成は認められなかった(図2-8D, D', d)。水晶体における *Mab2111*^{-/-}細胞

の消失は、*Mab2111* 遺伝子産物が水晶体形成過程において、細胞自律的に機能することを示唆する。

Mab2111^{-/-}水晶体プラコードにおいて、*Foxe3* の発現は減少する

Mab2111^{-/-}における水晶体形成不全を詳細に理解するために、水晶体形成関連遺伝子として知られる、*c-maf*, *Foxe3*, *Sox2*, *Six3* の発現を調べた。*Foxe3* は forkhead domain をコードする遺伝子であり、予定水晶体プラコードで発現が始まり、水晶体胞、および水晶体上皮で発現が維持されることが知られている (Blixt et al., 2000; Brownell et al., 2000)。また、*Foxe3* の forkhead domain に変異を持つ *dysgenetic lens (dyl)* 突然変異体マウスは水晶体胞と角膜の不完全分離、および水晶体上皮細胞の増殖異常を示すことが知られている (Blixt et al., 2000; Ormestad et al., 2002)。*c-maf* はロイシンジッパー型の転写調節因子をコードする遺伝子であり、陥入前の水晶体プラコードで発現が始まり、水晶体繊維細胞で発現が維持されることが知られている (Kawauchi et al., 1999)。ノックアウトマウスの解析から、*c-maf* は水晶体繊維細胞の分化に重要な役割を持つことが知られている (Kawauchi et al., 1999; Ring et al., 2000)。*Sox2* は HMG ボックス型の転写調節因子をコードする遺伝子であり、その発現量の上昇と水晶体プラコードの誘導との関連が示唆されている (Furuta and Hogan, 1998; Kamachi et al., 1998)。*Six3* は *sine oculis* に類似したホメオドメインをコードする遺伝子であり、頭部外胚葉での発現が、水晶体プラコード形成期に始まることが知られている (Lagutin et al., 2001)。*Pax6* はペアードタイプのホメオドメインをコードする遺伝子であり、水晶体誘導以前の頭部外胚葉と眼胞に発現しており、水晶体、および眼杯でも発現が維持されることが知られている (Walther and Gruss, 1991)。また、*Pax6* は正常な眼の発生に重要な役割を果たすことが知られている (Chow et al., 1999; Grindley et al., 1995; Hill et al., 1991)。

これらの、水晶体形成関連遺伝子の発現を *Mab2111*^{+/-} と *Mab2111*^{-/-} で比較した。水晶体誘導以前である、2 2 体節期の頭部外胚葉において、PAX6 と *Six3* の発現に変化は観られなかった。2 4 体節期において、*Sox2* の発現量上昇と、*c-maf* の発現開始が *Mab2111*^{-/-} でも *Mab2111*^{+/-} と同様に認められた。この時期に *Foxe3* の発現は *Mab2111*^{+/-}, *Mab2111*^{-/-} 共に認められなかった (data not shown)。2 8 体節期における、*Mab2111*^{+/-} 予定水晶体プラコードでは、*Foxe3* の顕著な

発現が認められた (図 2—9A)。一方、*Mab2111*^{-/-}では *Foxe3* の発現は認められなかった (図 2—9B)。これに対し、PAX6 の発現は *Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}で顕著な差が観られなかった (図 2—9C, D)。同様に *c-maf*, *Six3*, *Sox2* の発現も *Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}で差は観られなかった (data not shown)。35 体節期において、*Mab2111*^{-/-} 水晶体プラコードは陥入が停止し、水晶体胞の形成不全が認められた。*Mab2111*^{-/-} 水晶体プラコードにおいて、*Foxe3* の発現は微量ながら検出された (図 2—9F)。一方 PAX6, *c-maf*, *Sox2*, *Six3* の発現量は *Mab2111*^{+/-}と *Mab2111*^{-/-}で同程度であった (図 2—9G, H, data not shown)。40 体節期の *Mab2111*^{-/-}胚において、形成不全の水晶体プラコードは依然として認められたが、*Foxe3* の発現は検出されなかった (図 2—9J)。この時期に PAX6, *c-maf*, *Sox2*, *Six3* の発現は *Mab2111*^{-/-}水晶体プラコードで維持されていた (data not shown)。以上の結果から、*Mab2111* は *Foxe3* の水晶体プラコードにおける発現の開始と、それに続く発現の維持に必要であることが判明した。

dyl の解析から、*Foxe3* の欠損は、PDGF 受容体 (以下 *PDGF Re*) の発現減少を伴う細胞増殖不全を起こすことが知られている (Blixt et al., 2000)。PDGF シグナルは細胞増殖を亢進する役割をもつことが知られている (Heldin et al., 1998)。*Mab2111*^{-/-}で *Foxe3* の発現減少が観られたことから、*Mab2111*^{-/-}における *PDGF Re* の発現を調べた。その結果、予想通り *Mab2111*^{-/-}では *PDGF Re* が減少していた (図 2—10B)。これに対し、*PDGF Re* のリガンドである *PDGF a* の発現に差は観られなかった (図 2—10D)。次に、*Mab2111*^{-/-}の細胞増殖不全と細胞周期関連遺伝子の関係を検討した。D-type *cyclin* は細胞周期の進行に重要な因子であり、発生過程の水晶体では *cyclinD2* が発現することが知られている (Sherr, 1995; Zhang, 1999)。予想に反し、*Mab2111*^{-/-}水晶体プラコードで *cyclinD2* の発現に変化は認められず、同様に、*cyclinD1* の発現も野生型と顕著な差は観られなかった (図 2—10F, H)。一方ペアードタイプのホメオドメインをコードする *Pitx3* (Semina et al., 1997) は *Mab2111*^{-/-}で顕著な発現減少が認められた (図 2—10J) (考察参照)。

頭部外胚葉と眼胞における *Mab2111* の発現は PAX6 に依存する

Pax6 は *Sey* を含む種々の突然変異体の解析から、眼の発生過程で中心的な役割を担うと認識されている (Ashery-Padan and Gruss, 2001; Grindley et al., 1995;

Hill et al., 1991)。最近、*Le-mutant (Le)*の解析から、*Pax6*の水晶体形成における重要性が再認識された。*Le*は*Pax6*の活性を予定水晶体領域で特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスであり、水晶体の欠損を伴う眼形成異常を示す(Ashery-Padan et al., 2000)。

*Le*と*Mab2111^{-/-}*の表現型の類似性は、*Pax6*と*Mab2111*が同一の遺伝学的経路で働く可能性を示唆する。そこで、*Pax6*突然変異体である*Sey*における*Mab2111*の発現を調べた。22体節期の*Sey*ホモ接合体(*Sey/Sey*)において、*Mab2111*の発現は頭部外胚葉と眼胞両方で発現が顕著に減少していた(図2—11B)。32体節期では、*Sey/Sey*において、弱いながらも頭部外胚葉で*Mab2111*の発現が認められた(data not shown)。35体節期では、*Sey/Sey*の形成不全を起こした眼胞において、*Mab2111*の発現は野生型にくらべ顕著な減少が認められた。この時期*Sey/Sey*では水晶体胞は全く形成されないが、予定水晶体領域で*Mab2111*の弱い発現が認められた(図2—11D)。*Mab2111*が発現減少するのに対し、*Mab2112*の発現は、調べた全ての発生段階(22体節期~E12.5)において*Sey/Sey*でも野生型と同程度の発現が認められた(図2—11F, data not shown)。

2-3 考察

本章では、*Mab2111*^{-/-}マウスにおける眼形成異常が水晶体プラコードの細胞増殖異常を伴う水晶体形成不全により生じることを明らかにした。また、キメラマウスの解析から水晶体プラコードの発生異常は細胞自律的な作用により起きることを証明した。また、*Mab2111* は水晶体と眼杯両方に発現すること、および *Mab2112* は眼杯のみで発現することを確認し、眼杯では *Mab2112* が *Mab2111* の欠損を補償するため、水晶体に形態形成異常が生じることを示唆した。さらに、水晶体プラコード形成異常は *Foxe3* の発現減少に附随すること、一方 *c-maf*, *Sox2*, *Six3*, PAX6 は変化しないことを明らかにした。加えて *Sey* 変異体マウスで *Mab2111* の発現が減少することから、*Mab2111* の発現は PAX6 に依存することを明らかにした。よって、*Mab2111* の発現は PAX6 に依存し、*Mab2111* は細胞自律的に作用し、*Foxe3* の発現を制御することで、水晶体プラコードの生長に重要な役割を担うと結論した。

水晶体形成における *Mab2111* の役割

水晶体プラコードの形成には眼胞から頭部外胚葉への誘導シグナルが必要不可欠であることが知られている (Chow and Lang, 2001; Grainger, 1992)。最近の報告で、*Bmp* ファミリーと *Fgf* ファミリー分子が関与する誘導シグナルの重要性が示され、両因子の作用は *Pax6* の発現誘導に集約されることが明らかとなった (Faber et al., 2001, Furuta and Hogan, 1998, Wawersik et al., 1999)。*Mab2111*^{-/-}において、水晶体プラコード形成過程で PAX6 の発現は変化しない。また、*Sox2*, *c-maf* も正常に発現する。*Mab2111*^{-/-}において、水晶体プラコードが、生長不全ではあるが形成されることは、PAX6, *Sox2*, *c-maf* の正常な発現と矛盾しない。よって、*MAB2111* が欠損しても水晶体の誘導は起こりうると判断した。また、*Mab2111*^{-/-}の水晶体様痕跡組織で *crystallin* が発現することから、*Mab2111* は水晶体繊維細胞の分化には不可欠では無いと判断した。

一方、*Mab2111*^{-/-}において、*Foxe3* の発現減少を確認した。*Foxe3* は水晶体プラコードの形成に同期して発現が開始するが、*Mab2111*^{-/-}ではその発現開始時期に遅れが観られた。このことは、水晶体プラコード形成の遅延を示唆する。発生段階が進み 3 5 体節期になると、*Mab2111*^{-/-}水晶体プラコードで *Foxe3* は

微量ながら発現する。このことから、*Mab2111* は *Foxe3* の発現を間接的、あるいは部分的に制御すると考えられる。40体節期では、*Foxe3* の発現は完全に消失する。このことは *Mab2111* が *Foxe3* の発現の維持に必要であることを示唆する。35体節期 *Mab2111*-/- 水晶体プラコードで観られる *Foxe3* 陽性細胞のその後の運命は不明であるが、この時期に TUNEL 陽性細胞が増加するため、細胞死により排除されると推察される。この推察は、*Foxe3* の突然変異体(*dyl*)で細胞増殖率の低下と、アポトーシスの増加が起こることからも支持される(Blixt et al., 2000)。 *Mab2111*-/- において、BrdU の取り込み減少と、*Foxe3* の発現減少は同時期に観察される。また、*dyl* と同様に、*Mab2111*-/- でも *PDGFR α* の発現が減少する(Blixt et al., 2000)。PDGF シグナルは細胞増殖を亢進する働きが知られている(Heldin et al., 1998)。よって、*Foxe3* の発現減少が *Mab2111*-/- の水晶体プラコード形成不全を引き起こすと考えられる。しかしながら、*dyl* に比べ *Mab2111*-/- は、より重度な水晶体形成不全を示す。*dyl* は突然変異体であり、*Foxe3* の DNA 結合活性が低下した loss of function allele であることが示されているが、null allele であるかどうかは不明である(Ormestad et al., 2002)。 *Mab2111* と *dyl* の表現型の違いは、*dyl* に *Foxe3* の活性が残存するため表現型が軽度になるとも考えられるが、*Mab2111* 依存的な他の要因の存在を示唆しているとも考えられる。

最近、*Pitx3* が眼形成異常を示す *aphakia(ak)* 表現型の原因遺伝子として報告された(Rieger et al., 2001; Semina et al., 2000)。 *Pitx3* は *Foxe3* と同様の発現様式を示し、かつ *ak* と *dyl* は類似した水晶体形成異常を示す。本研究では、*Mab2111*-/- における *Pitx3* の発現減少を確認した。この結果は、*Mab2111* と *Pitx3* の遺伝学的相互作用を示唆する。*ak* と *dyl* で観られる、水晶体胞の角膜からの分離不全(Varnum and Stevens, 1968)、および細胞増殖異常は *Mab2111*-/- でも認められ、このことから、*Mab2111*、*Pitx3*、*Foxe3* が水晶体形成過程で同一の遺伝学的経路で機能することが支持される。したがって、*Mab2111*-/- に観られる重度な水晶体形成不全は、*Foxe3* に加え *Pitx3* も発現減少することに起因すると推測された。

Mab2111-/- は水晶体形成不全を示すが、*Mab2111* は水晶体と眼杯両方に発現する。このため *Mab2111* が水晶体自体、眼杯どちらに必要なのかは判断が困難である。この問題を検討するためにキメラマウスを作製した。*Mab2111*-/- 細胞の性質が周囲の野生型細胞で回復するならば、水晶体において *Mab2111*-/- と野

生型の細胞は混在するはずである。しかしながら、キメラマウスの水晶体には *Mab2111*^{-/-}細胞は観られず、*Mab2111*^{-/-}細胞は発生過程で水晶体から排除されたと考えられた。*Mab2111*^{-/-}細胞の水晶体からの消失は *Mab2111* が水晶体形成過程で必要不可欠であり、かつ *Mab2111* は細胞自立的に作用することを示唆する。これに対し、網膜における *Mab2111*^{-/-}細胞と野生型細胞の混在は、*Mab2111* が眼杯形成には不要であることを示す。また、*Mab2111*^{-/-}では、水晶体プラコードの正常な誘導が起こることからも、*Mab2111* の欠損は眼杯形成には影響しないと判断した。眼杯には *Mab2112* が *Mab2111* と重複して発現することから、*Mab2111* の欠損は *Mab2112* により補償されると考えられる。

水晶体形成不全に加え、*Mab2111*^{-/-}では虹彩、毛様体、前眼房の未形成と角膜の形成不全が観られる。発生過程において、水晶体の存在が眼杯の発生に影響を与えることが知られている(Reneker et al., 1995)。このため、虹彩や毛様体の消失は、水晶体形成不全による水晶体からの誘導因子の欠損により生じると考えられる。しかしながら、*Mab2111* は虹彩や毛様体に弱いながらも発現することから、これらの器官形成に直接的に作用するとも考えられる。

以上の結果から、*Mab2111* は水晶体形成過程で細胞自立的に働き、水晶体源基の細胞増殖に作用すると結論する。

***Mab2111* と眼形成関連遺伝子の関係**

Mab2111^{-/-}マウスで観られる水晶体形成不全と網膜の異常形態は *Le*-mutant(*Le*)に観られる眼形成異常と類似する。*Mab2111*^{-/-}と *Le* の表現型の類似性から *Mab2111* と *Pax6* が水晶体形成過程で同一の遺伝学的経路で働く可能性が示唆される。キメラマウスの解析で明らかにされた *Mab2111* の細胞自立的な役割は、*Pax6* でも同様に見出されている(Collinson et al., 2000; Fujiwara et al., 1994; Quinn et al., 1996)。さらに、*Pax6* と *Mab2111* は眼胞と頭部外胚葉で重複して発現する。以上の知見から、本研究では *Pax6* 突然変異ホモ接合体 (*Sey/Sey*) における *Mab2111* の発現を検討した。予想通り、*Sey/Sey* において、*Mab2111* の発現減少が確認された。このことは、*Mab2111* の発現が PAX6 依存的であることを示唆する。一方、*Mab2111*^{-/-}では PAX6 の発現は変化しない。したがって、*Mab2111* は眼胞と頭部外胚葉において、*Pax6* の遺伝学的下流に位置すると結論する。同じく *Pax6* の下流で発現制御されると考えられる *Six3* は、*Le* で発

現が消失するが *Mab2111*^{-/-}では発現が変化しない(Ashery-Padan et al., 2000)and data not shown)。この違いは、*Mab2111* と *Six3* は共に *Pax6* の下流に位置するが、異なる遺伝学的経路で働くことを示唆している。

dyl と *Mab2111*^{-/-}の類似した表現型、および *Mab2111*^{-/-}で *Foxe3* の発現が減少することから、*Mab2111* は水晶体形成過程で *Foxe3* の遺伝学的上流に位置すると考えられる。また、最近の報告で *Pax6* の頭部外胚葉での発現を制御するシスエレメントを欠損したマウス (*PAX6*^{ΔEE}) が *dyl*, および *Mab2111*^{-/-} と類似した表現型を示すことが明らかとなった。さらに *PAX6*^{ΔEE} において *Foxe3* の発現が減少することから、*Foxe3* は *Pax6* の下流に位置することが示されている (Dimanlig et al., 2001)。これらの知見から、水晶体形成過程において *Pax6*, *Foxe3*, *Mab2111* は同一の遺伝学的経路で働くこと、すなわち *Mab2111* は *Pax6* と *Foxe3* の中間に位置することが推測される (図 2-12)。PAX6 は、分化のみならず、細胞周期を制御することが示唆されている (Estivill-Torrus et al., 2002; Takahashi and Osumi, 2002)。様々な研究により、多くの転写調節因子が PAX6 の下流に位置することが知られるが、細胞増殖制御に関連する因子は全く知られていない。*Mab2111* は、機能未知分子であるが、*Pax6* の下流因子として細胞増殖に作用することが推測される。

Bmp7 はノックアウトマウスの解析から、頭部外胚葉における *Pax6* の発現に必要であることが知られている (Wawersik et al., 1999)。最近、*Fgf* シグナルと *Bmp7* シグナルが同一の遺伝学的経路で働き、*Pax6* の発現を誘導することが示された。また、*Sey* マウス、*Bmp7* ノックアウトマウス、*Bmp4* ノックアウトマウスにおいて、*Sox2* の発現が減少することから、*Sox2* がこれらの遺伝子の遺伝学的下流に位置することが示されている (Faber et al., 2001; Furuta and Hogan, 1998; Wawersik et al., 1999)。*Mab2111*^{-/-}頭部外胚葉における PAX6 の発現は *Fgf* シグナルと *Bmp7* シグナルが正常に働いていることを示唆する。また、*Sox2* の発現が正常に起こることから、*Mab2111*^{-/-}において *Bmp4* シグナルは正常に働き、水晶体プラコード形成の初期段階は正常であることが示唆される。また、*Bmp4* および *Bmp7* は *Mab2111*^{-/-}で正常に発現する (data not shown)。これらの知見から、*Fgf* シグナルと *Bmp* シグナルは *Pax6* を介し、*Mab2111* の遺伝学的上流に位置するものと推測される (図 2-12)。

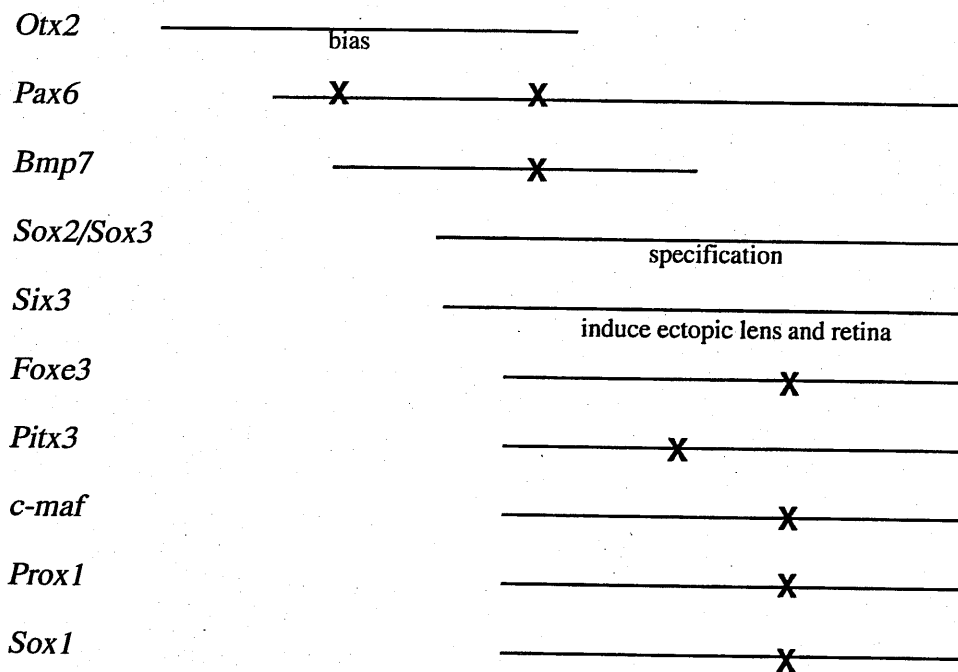
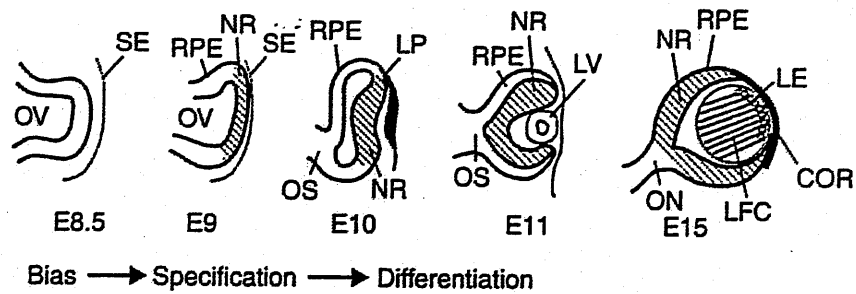


図2—1 脊椎動物における眼の発生
 (上)眼の発生の模式図。SE, 頭部外胚葉; RPE, 網膜色素上皮; NR, 神経性網膜; LP, 水晶体プラコード; OS, 眼柄; LV, 水晶体胞; LE, 水晶体上皮; LFC, 水晶体繊維細胞; COR, 角膜。 (下) 水晶体形成過程における遺伝子発現とその役割。遺伝子の発現を直線で示した。ノックアウトマウス、変異体マウスの解析から明らかにされた、その遺伝子の予想される機能時期をXで示した。Otx2, Sox2/3, Six3に関しては示唆される役割を示した。(Ashery-Padan et. al. 2001の図を改編)

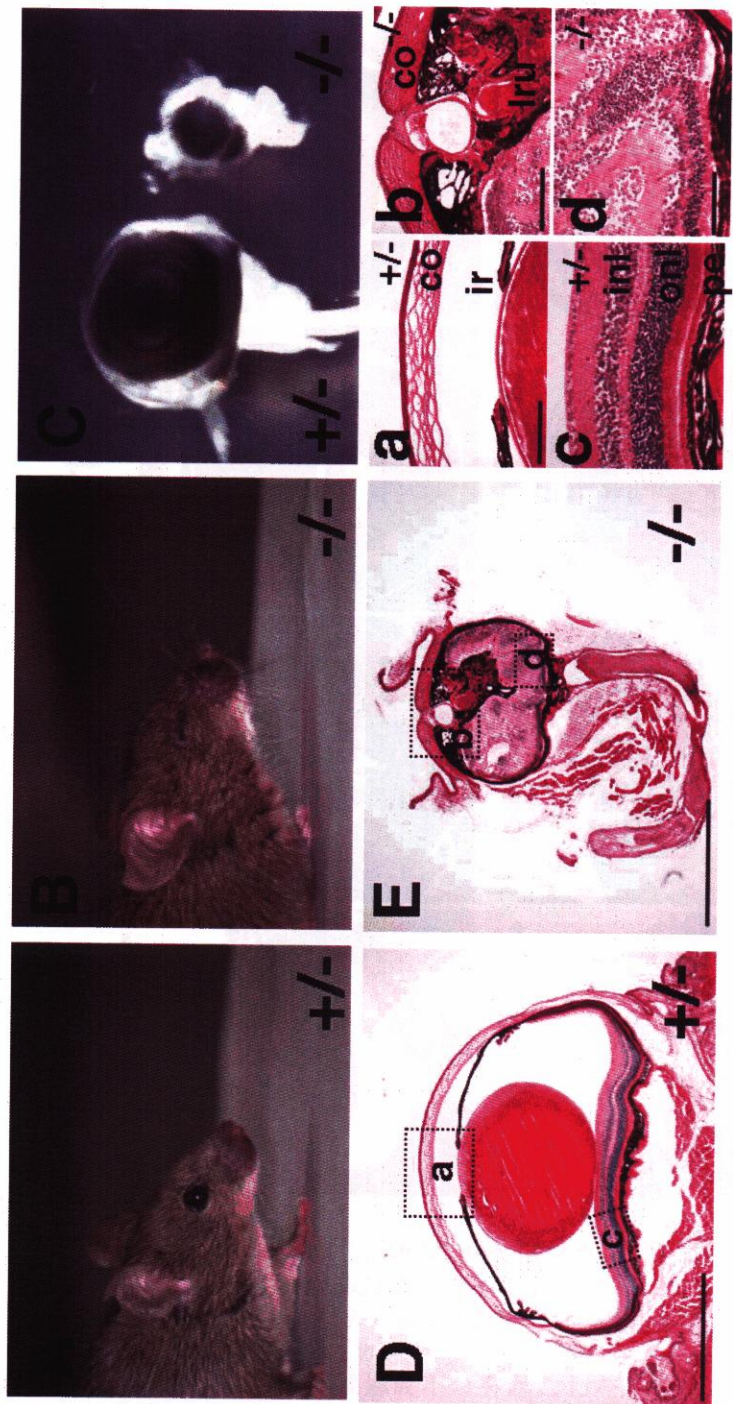


図2—2 成体*Mab2111*欠損マウスの眼形成異常
 成体*Mab2111*^{+/+}-マウス(A)と*Mab2111*^{-/-}-マウス(B)。(C)摘出した眼。(左)
Mab2111^{+/+} (右) *Mab2111*^{-/-}。(D, E) 眼の組織切片のHE染色像。(D) *Mab2111*
^{+/+} (E) *Mab2111*^{-/-}。(a-d)D, Eの枠の拡大図。co, 角膜; ir, 内顆粒層; ir, 虹彩;
 Iru, 水晶体様痕跡組織; on, 眼柄; onl, 外顆粒層; pe, 網膜色素上皮。Scale bars, 1
 mm (D, E,), 200 μm (a, b), 100 μm (c, d).

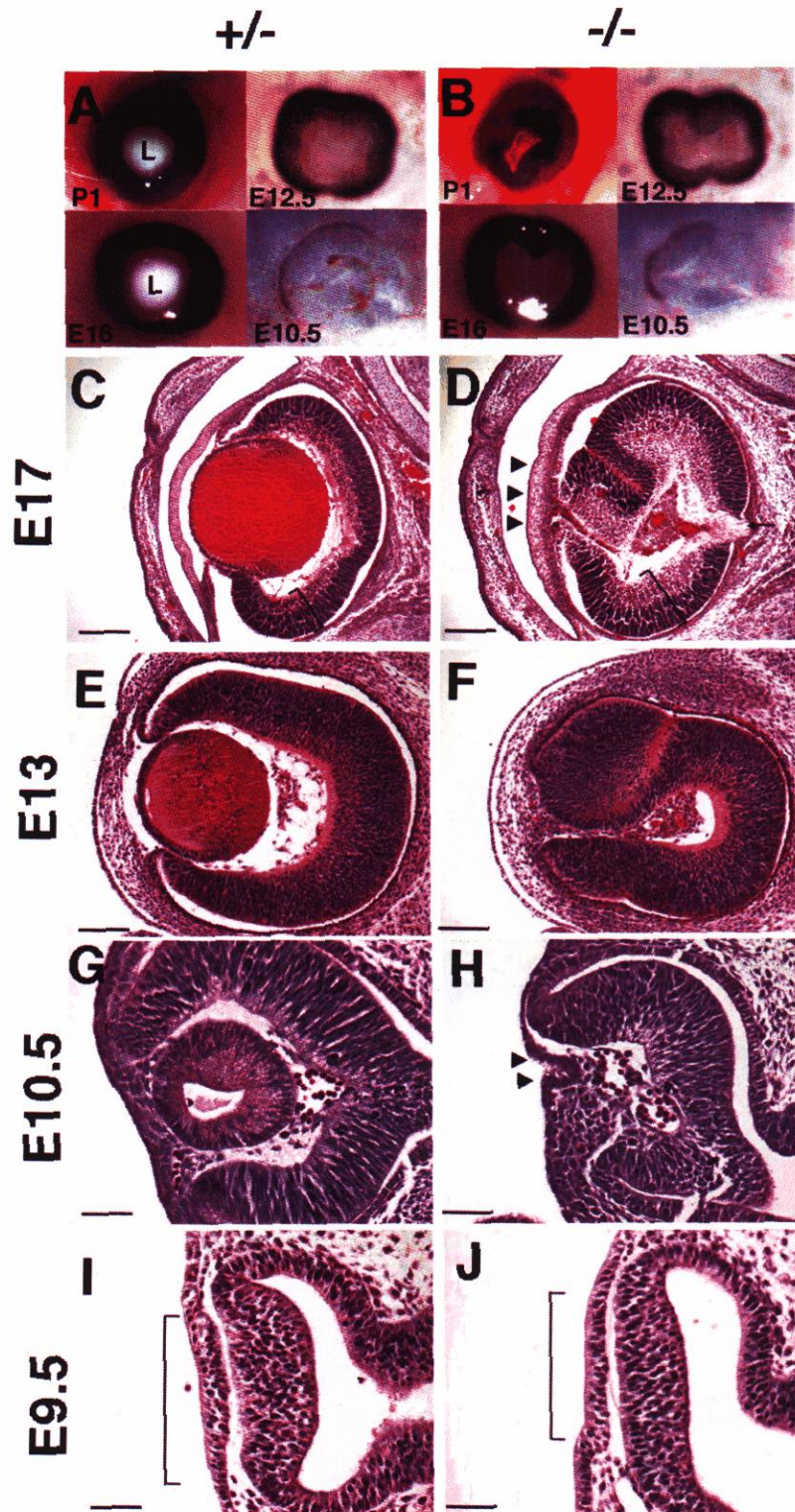


図2—3 発生過程における*Mab21l1*欠損マウス眼形成異常
Mab21l1^{+/+}マウス(A)と*Mab21l1*^{-/-}マウス(B)の外観。(C, E, G, I) *Mab21l1*^{+/+}と(D, F, H, J) *Mab21l1*^{-/-}のHE染色像。E17 *Mab21l1*^{-/-}は角膜の膨
 突(矢尻)と網膜の厚化(カギカッコ)が観られたが、視神経束(矢
 印)が認められた。E10.5は形成不全を起こした水晶体プラコードが
 認められた(矢尻)。E9.5は頭部外胚葉の肥厚が少なく、かつ狭い領
 域で認められた(カギカッコ)。Scale bars, 200 μ m (C, D), 100 μ m (E,
 F), 50 μ m (G-J).

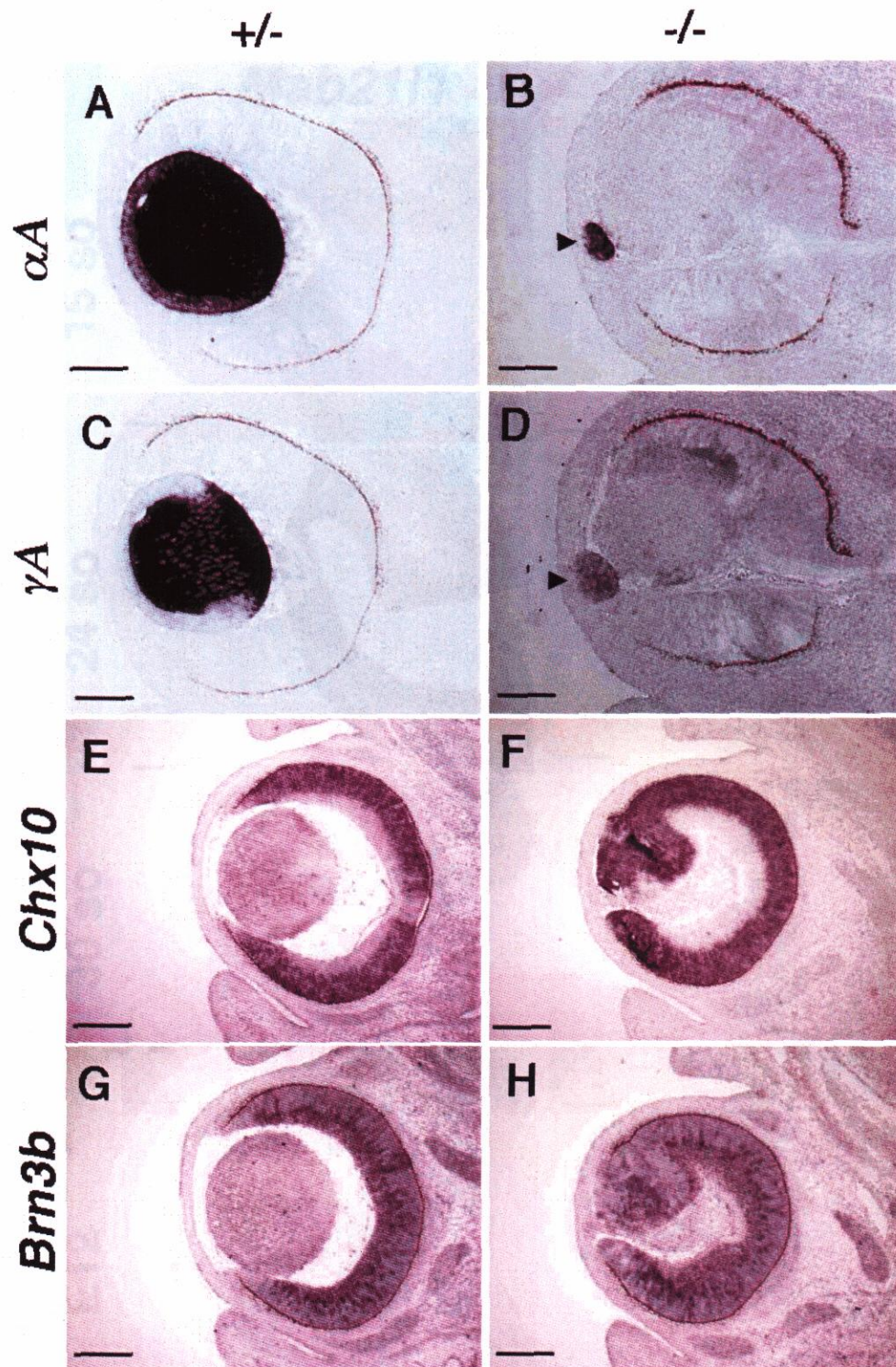


図2—4 *Mab21l1*欠損マウスにおける*crystallin*と網膜形成関連遺伝子の発現
 (A-D)E12.5のin situ hybridization。 (E-F) E15のin situ hybridization。 (A, B) αA -*crystallin* (C, D) γA -*crystallin* (E, F) *Chx10*(G, H)*Brn3b*。水晶体様痕跡組織に*crystallin*の発現が認められた。 Scale bars, 100 μm (A-D), 200 μm (E-F).

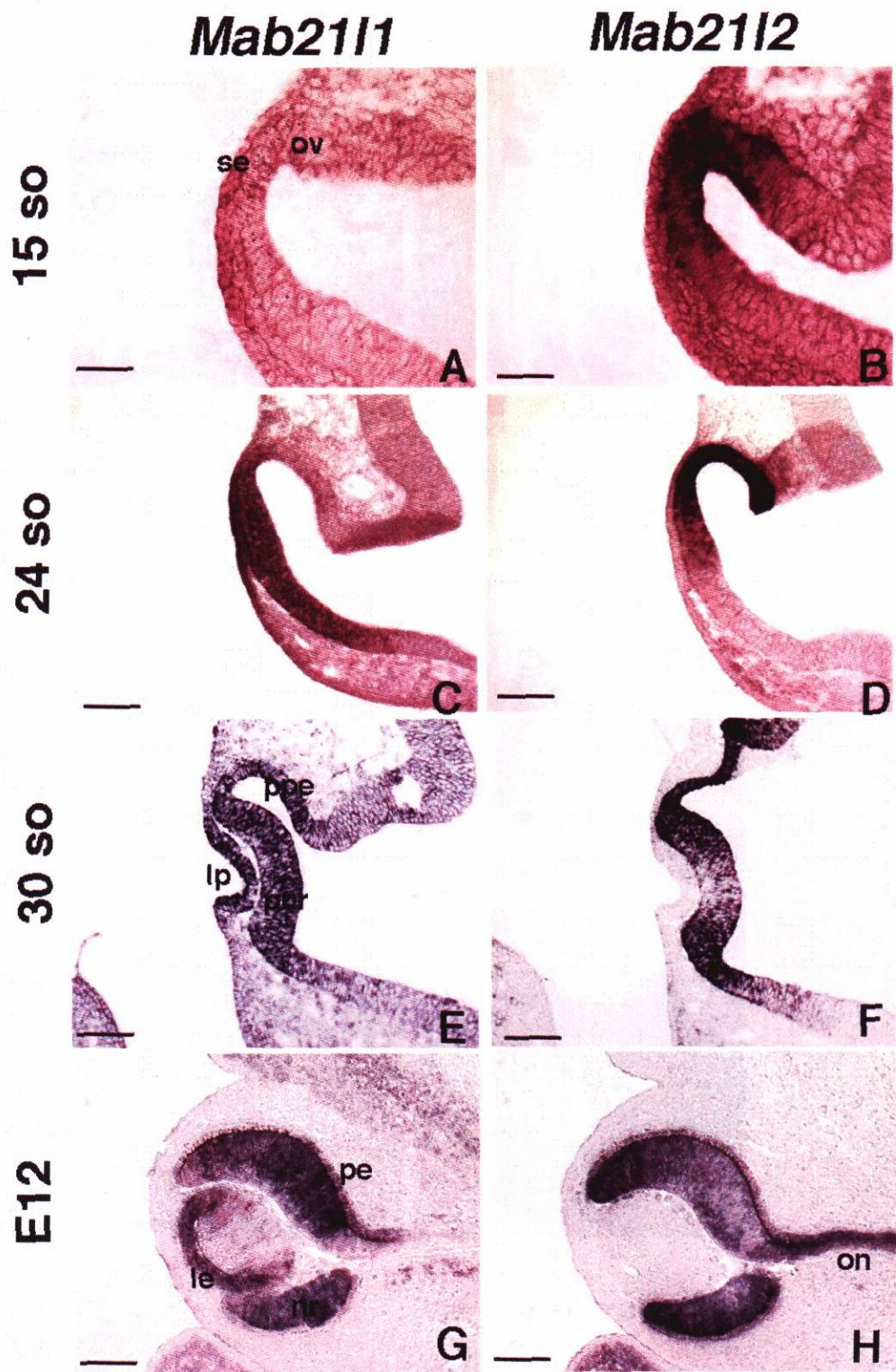


図2—5 発生過程の眼における*Mab2111*と*Mab2112*転写産物の発現
 (A-F)coronal凍結切片。(G,H)coronalパラフィン切片。lp, 水晶体プラコード; nr, 神経性網膜; on, 視神経束; ov, 眼胞; pe, 網膜色素上皮; pnr, 予定神経性網膜; ppe, 予定網膜色素上皮; le, 水晶体上皮; se, 頭部外胚葉
 Scale bars, 50 μ m (A, B), 100 μ m (C-H)

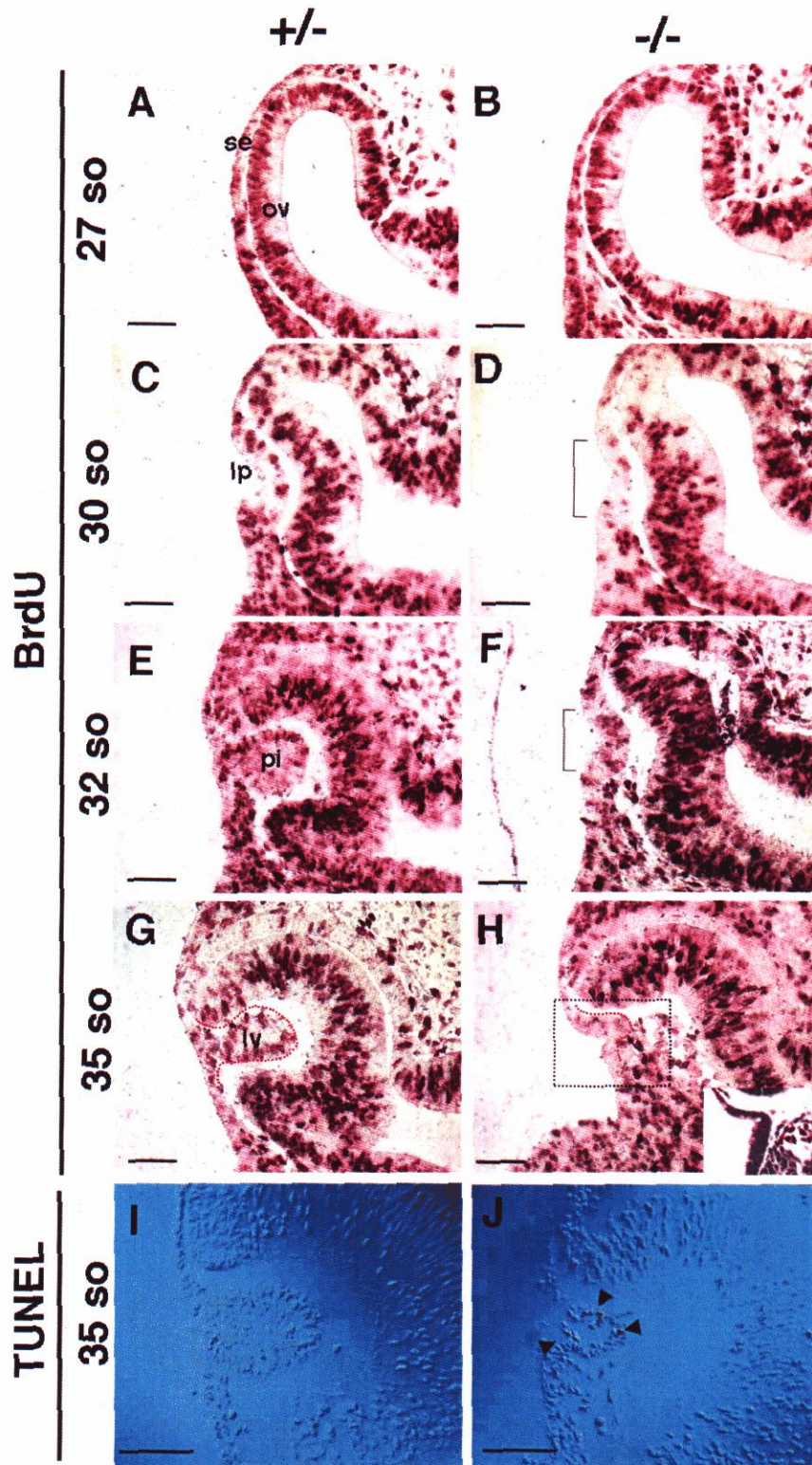


図2—6 *Mab21l1*欠損マウスにおける細胞増殖と細胞死
 (A-H) BrdUの免疫組織染色像。*Mab21l1*^{-/-}ではBrdUの取り込み減少が認められた(カギカッコ)。(I, J) TUNEL法による細胞死の検出。*Mab21l1*^{-/-}でTUNEL陽性細胞が若干増加した(矢尻)。lp, 水晶体プラコード; nr, 神経性網膜; on, 視神経束; ov, 眼胞; pe, 網膜色素上皮; pl, 水晶体孔; lv, 水晶体胞; se, 頭部外胚葉
 Scale bars, 50 μ m.

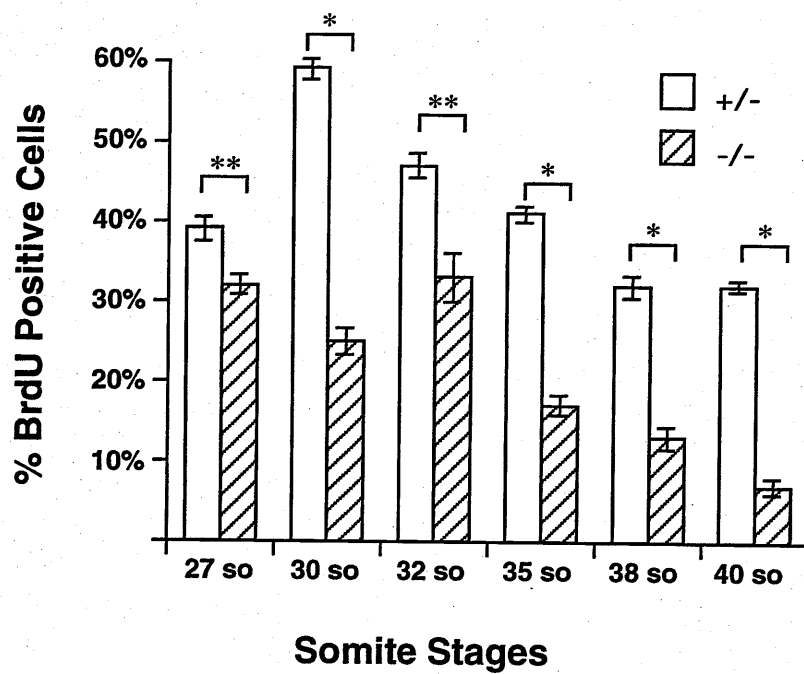


図 2—7 *Mab21l1*^{+/-}と*Mab21l1*^{-/-}水晶体源基におけるBrdU取り込み効率
Mab21l1^{-/-}において、BrdU陽性細胞の割合は減少した。有意水準は
 studentのt検定により算出した。** P<0.004, *P<0.0001

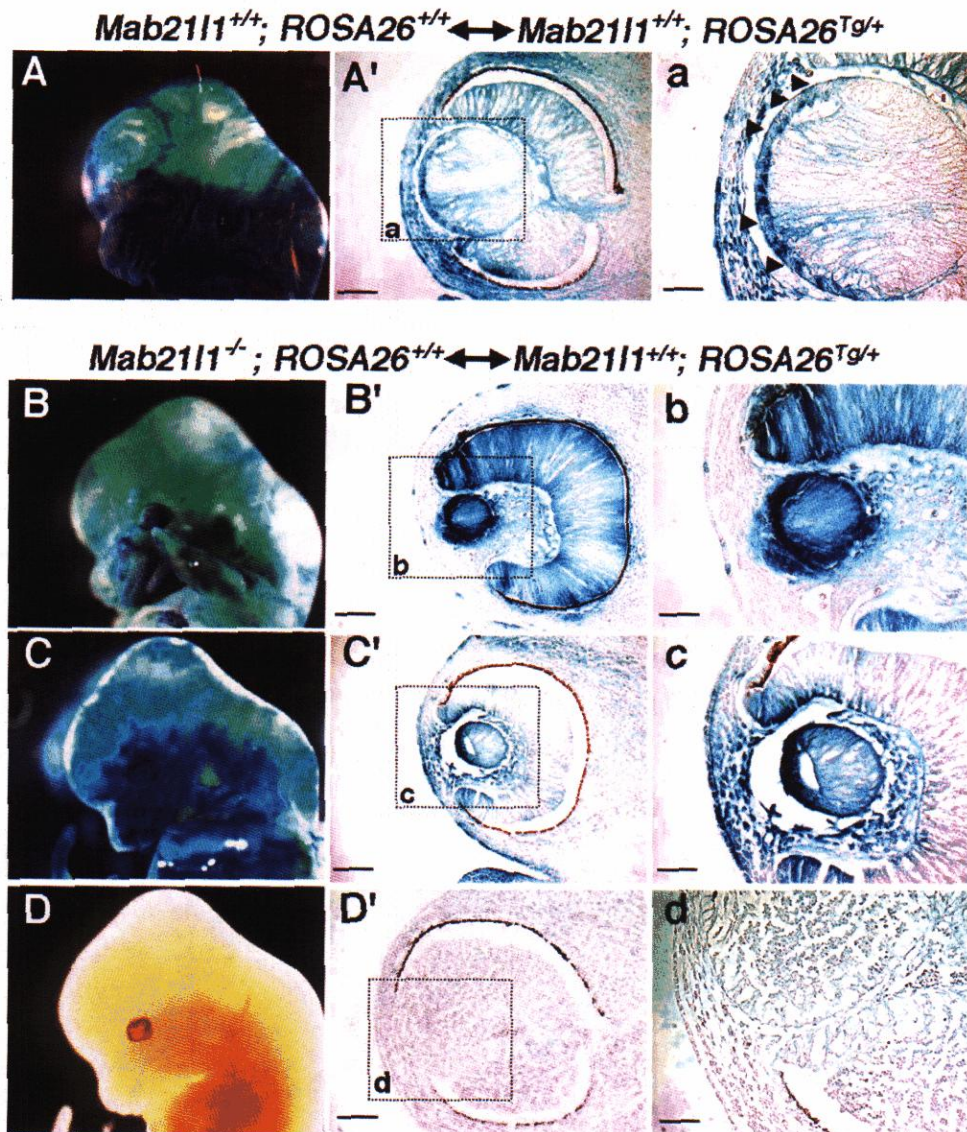


図2—8 眼形成過程におけるMab2111^{-/-}細胞のキメラ解析
 (A) *Mab2111*^{+/+}キメラの外観。(B-D) *Mab2111*^{-/-}キメラの外観。(A'-D')
 A-Dと同一個体の組織切片像。(a-d) A'-D'の枠内の拡大図。*Mab2111*^{+/+}
 キメラにおいてβ-galactosidase 陰性細胞は網膜(A)でも、水晶体(a, 矢
 尻)でも認められた。*Mab2111*^{-/-}キメラでは*Mab2111*^{-/-}細胞(β-
 galactosidase 陰性細胞)は水晶体では観られず、網膜では認められた
 (B', C', b, c)。*Mab2111*^{-/-}細胞が全体を占める*Mab2111*^{-/-}キメラでは
Mab2111^{-/-}マウスと同様に水晶体欠損が認められた(D, D', d)。
 Scale bars, 100 μm (A'-D'), 50 μm (a-d)

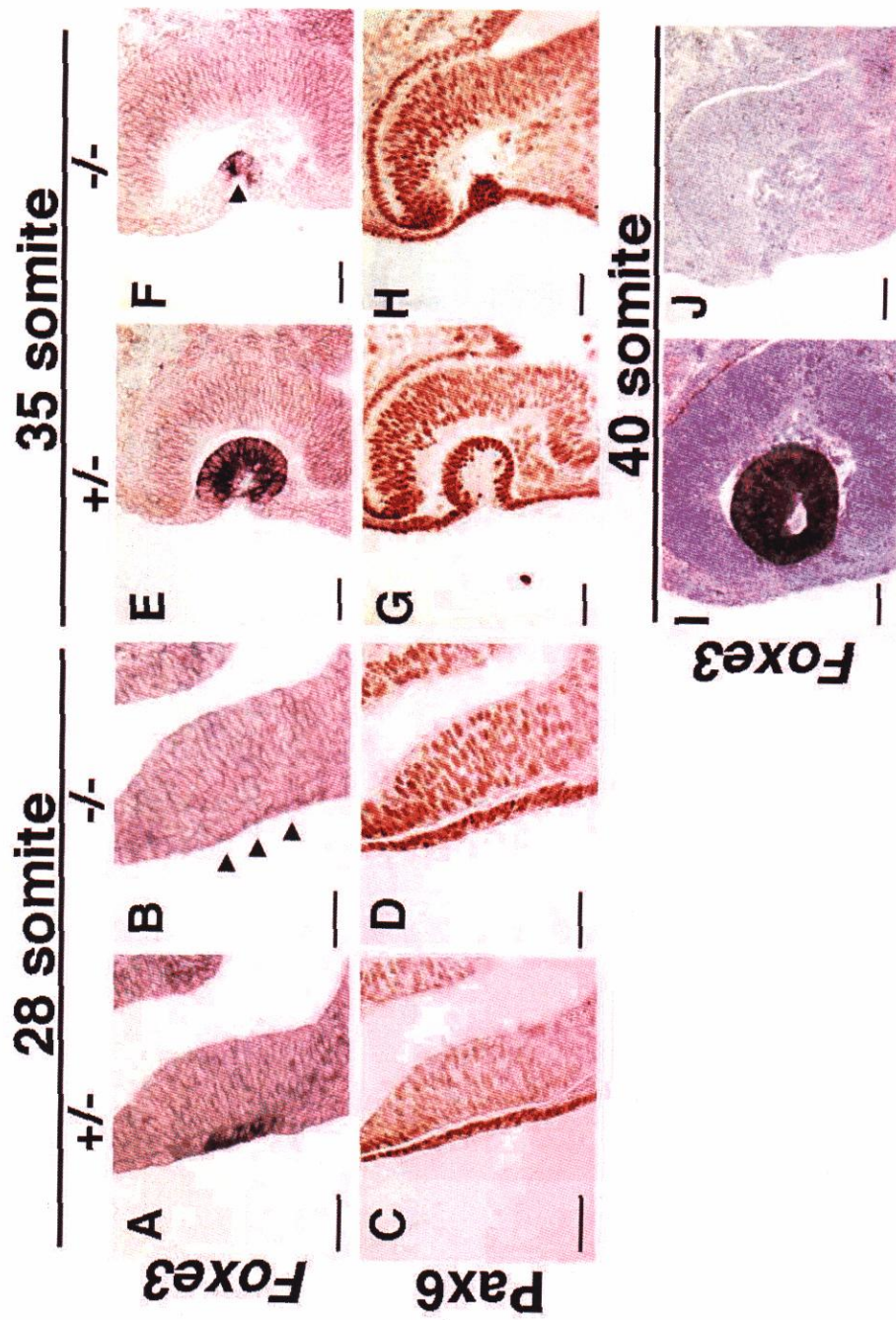


図2—9 *Mab2111*^{+/-}と*Mab2111*^{-/-}水晶体源基におけるPAX6とFoxe3の発現 (A, B, E, F, I, J)Foxe3の in situ hybridization (C, D, G, H) PAX6の免疫組織染色像。*Mab2111*^{-/-}においてFoxe3の発現減少が認められた (矢尻)。Scale bars, 50 μ m.

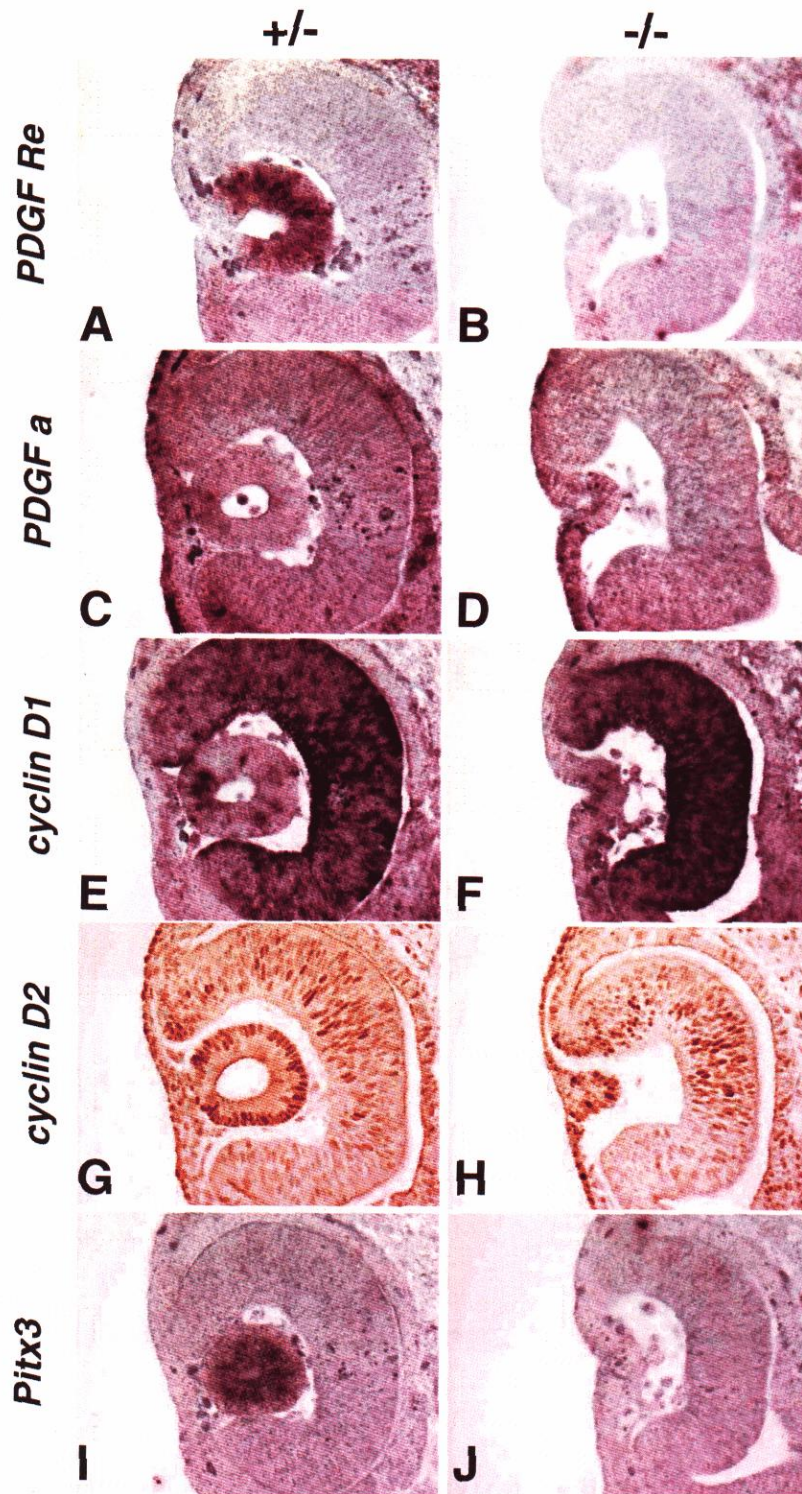


図2—10 *Mab21l1*^{+/-}と*Mab21l1*^{-/-}水晶体源基における
cyclin, *PDGFa*, *PDGF Re*, *Pitx3*の発現
 全て37体節期の凍結切片。(A-E, I, J) in situ hybridization (G, H)
*cyclin D2*の免疫組織染色像。*Mab21l1*^{-/-}において、*PDGF Re*と
*Pitx3*の発現減少が認められた。

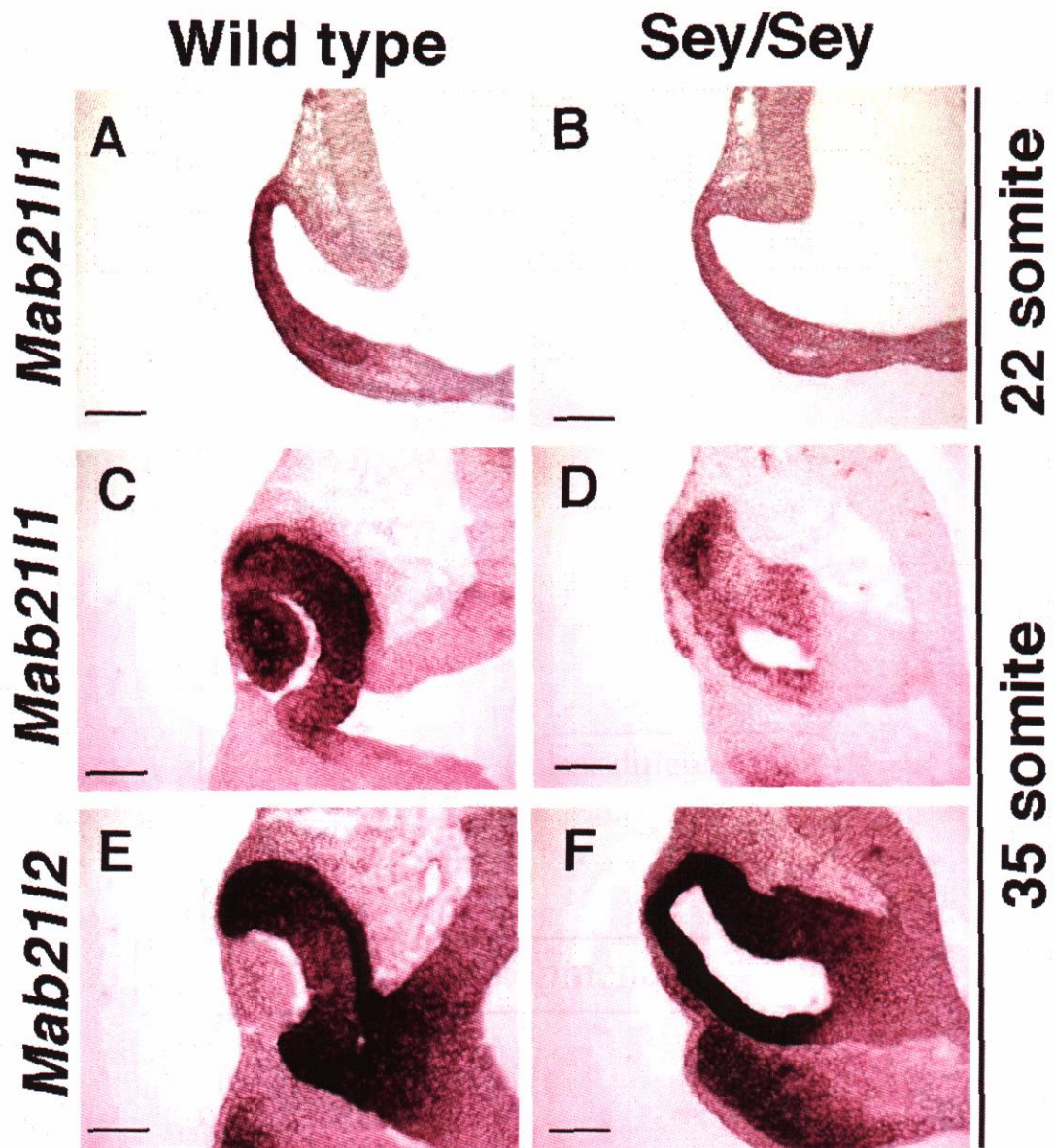


図2—11 Sey/SeyにおけるMab2111の発現
 (A, C, E)野生型。(B, D, F)Sey/Sey。Sey/Seyにおいて、Mab2111の発現は頭部外胚葉と眼胞で減少した。Mab2112の発現に変化は観られなかった。Scale bars, 100 μ m.

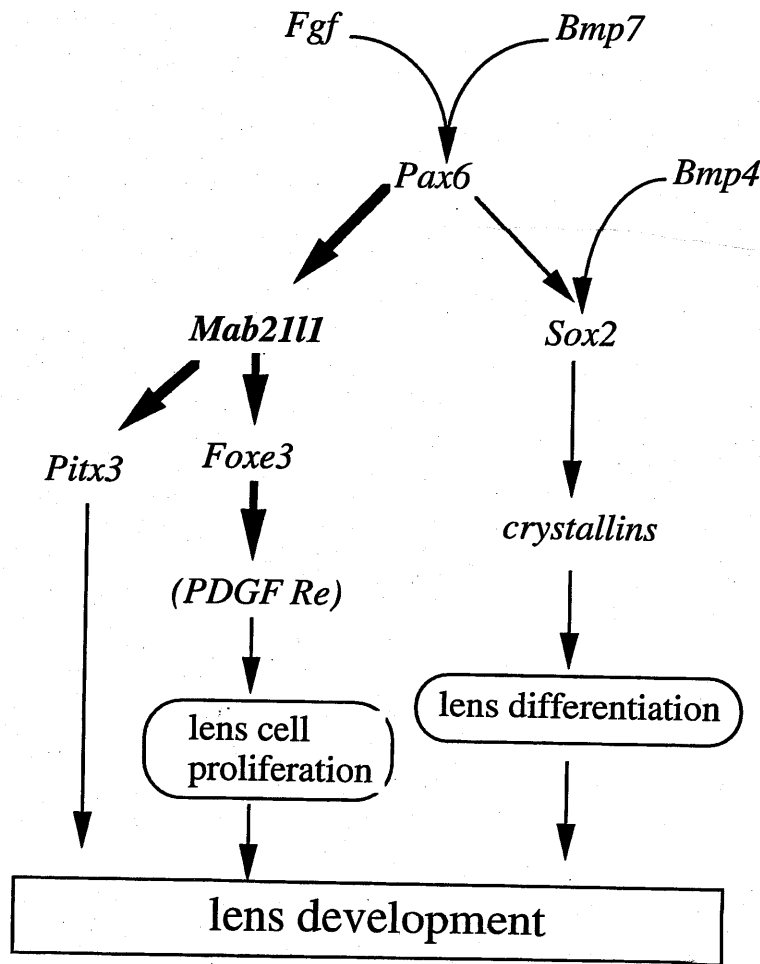


図2—12 水晶体形成過程における*Mab2l1l*の遺伝学的経路
 本研究で明らかにした遺伝学的経路を太線矢印で示した。
 矢印はこれまでの研究で明らかとなっていた遺伝学的経路。

第三章

網膜、および腹部体壁における *Mab21l2* の役割

3-1 序

網膜の発生は幾つかの段階を経て行われる。まず、中枢神経系である終脳の一部で眼胞源基としての運命が決定する。眼胞形成後、水晶体胞の形成に伴い眼胞の陥入が起こり眼杯が形成される。腹側眼杯の盛んな生長により二層構造が形成され、その後、神経性網膜、網膜色素上皮細胞層、眼柄が形成される。そして、神経性網膜の分化、多層化を経て、成熟した網膜が形成される。これらの発生段階では種々の転写調節因子が重要な役割を持つことが明らかにされている(図3-1)(Kondo, 2002; Chow and Lang, 2001; Marquardt and Gruss, 2002)。

Otx2 は *bicoid* タイプのホメオドメインをコードする転写調節因子であり、頭部中枢神経系で発現が始まり予定眼胞領域で眼形成関連遺伝子の中で最も初期に発現する(Matsuo et al., 1995)。*Otx2*^{+/-}マウスで小眼症が観られること、および *Otx1*^{-/-}、*Otx2*^{+/-}マウスは眼の組織特異性に異常が観られることから、*Otx2* は *Otx1* と共に初期中枢神経系における予定眼胞領域を規定する役割が示唆されている(Martinez-Morales et al., 2001; Matsuo et al., 1995)。予定眼胞領域の運命決定の後、*Rx*、*Six3*、*Pax6*、*Lhx2* が眼胞源基で共発現し、その発現は眼胞形成過程で維持される(Furukawa et al., 1997; Grindley et al., 1995; Oliver et al., 1995; Porter et al., 1997)。*Rx* はペアードタイプのホメオドメインをコードする転写調節因子であり、そのノックアウトマウスは眼胞を欠損することが知られている(Mathers et al., 1997; Zhang et al., 2000)。*Six3* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、メダカ胚、およびカエル胚に強制発現すると網膜肥大に加え異所的に網膜を形成することが示されている(Bernier et al., 2000; Loosli et al., 1999)。このことから、*Rx*、*Six3* は共に網膜源基の形成に重要な役割を担うことが支持される。*Pax6* はペアードタイプのホメオドメイン、*Lhx2* は Lim ホメオドメインをコードする転写調節因子であり、*Pax6* 突然変異体(*Small eye*, [*Sey*])と *Lhx2* のノックアウトマウスは共に眼胞は形成されるが眼杯形成が起こらないことから、両遺伝子は眼杯形成後の網膜形成過程で重要な役割をもつと考えられている(Grindley et al., 1995; Porter et al., 1997)。*Pax2* はペアードタイプのホメオドメイン、*Vax1* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、共に眼柄に発現することが知られている(Favor et al., 1996; Ohsaki et al., 1999)。*Pax2*、および *Vax1* を強制発現すると、*Rx* と *Pax6* の発現減少と、網膜の形成不全が生じるこ

と(Hallonet et al., 1999; Macdonald et al., 1995)、*Vax1* ノックアウトマウスは眼柄に換わり神経性網膜が異所的に形成されること(Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999)、*Pax2* 突然変異体は眼柄に換わり網膜色素上皮細胞が異所的に発生することが知られている(Favor et al., 1996)。これらの結果から、眼柄において *Vax1* は神経性網膜の形成を抑制し、*Pax2* は網膜色素上皮の形成を抑制することが支持される。*Tbx5* は T ボックス型転写調節因子であり、神経性網膜の背側に発現することが知られている。*Vax2* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、*Pax2* と共に腹側神経性網膜で発現することが知られている。*Tbx5* は網膜源基で異所的に強制発現すると、網膜を背側化することが知られる(Koshiba-Takeuchi et al., 2000)、*Vax2*、および *Pax2* は網膜を腹側化することが示されている(Schulte et al., 1999)。また、*Tbx5* は *Vax2* と *Pax2* の発現を抑制し、*Vax2* は *Tbx5* の発現を抑制することから、*Tbx5* は神経性網膜の背側化決定因子、*Vax2* は腹側化決定因子であると考えられている。*Chx10* はペアードタイプのホメオドメインをコードする転写調節因子であり、神経性網膜源基で発現が始まり、後に双極細胞に発現が限局する(Liu et al., 1994)。*Chx10* の突然変異体(*ocular retardation, [or]*)は神経性網膜の細胞増殖異常を示すこと、および *Chx10* は成体マウスで見い出された網膜幹細胞に発現することから、神経性網膜において細胞増殖を制御する可能性が示唆されている(Tropepe et al., 2000)。神経性網膜の分化過程では光受容細胞(錐体細胞、桿体細胞)、介在神経細胞(水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞)、ガングリオン細胞が発生し、網膜色素上皮と共に多層構造から構成される成熟した網膜が形成される(Chow and Lang, 2001)。神経性網膜から派生する細胞の発生には *Hes1*, *Hes5*, *Math5*, *Neurogenin2* 等の basic helix loop helix 型の転写調節因子が重要な役割を持つことが知られている(Brown et al., 1998; Marquardt and Gruss, 2002; Sasai et al., 1992; Wang et al., 2001)。

Mab21l2 は本研究二章で網膜源基に発現することが示されたが、網膜形成過程における役割は知られていない。また、*Mab21l2* は中枢神経系、肢芽、鰓弓で *Mab21l1* と共発現するため、*Mab21l1* の欠損を *Mab21l2* が補償することが *Mab21l1*^{-/-} の表現型から示唆された。したがって、これらの領域における *Mab21l1*/*Mab21l2* の役割は明らかにされていない。そこで、本章では *Mab21l2* ノックアウトマウスを作製し、網膜形成過程における *Mab21l2* の役割に加え、*Mab21l1*/*Mab21l2* 二重欠損マウスを作製し *Mab21l1*/*Mab21l2*(*mab-21* ファミリー)の生体内における役割を明らかにすることを目的とした。

3-3 結果

Mab21l2 欠損マウスの作出

生体内での *Mab21l2* の役割を明らかにするために、*Mab21l2* 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。まず、*Mab21l2* cDNA をプローブとして、129系統マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、*Mab21l2* ORF を含むクローン#736 および#717 を得た。また、#736 の3'末端に位置する BamHI-EcoRI 0.8 kb をプローブとして、クローン#4 を得た。これらのクローンを用いて制限酵素地図を作製した。その結果、クローン#736 は *Mab21l2* ORF をはさむ上流約 4kb と下流約 8kb を含むこと、クローン#717 は *Mab21l2* ORF を含む上流約 13 kb と下流 0.2 kb を含むこと、およびクローン#4 は *Mab21l2* ORF 下流約 8kb から 20kb を含むことが判明した。クローン#736 と#717 を用い、Targeting vector 作製した (図3-2)。定法にしたがって、キメラマウス、および F1 マウスを作出し、サザンプロットにより遺伝子型を確認した (図3-2B)。得られたヘテロ接合型マウスは正常であった。ヘテロマウスを交配し、得られた仔の遺伝子型を生後3週間目で確認した。野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型マウスの出現頻度はそれぞれ39%、61%、0%であった (表3-1)。このことから、*Mab21l2*^{-/-} は胎生致死であることが示唆された。ホモ接合型マウスにおいて *Mab21l2* 転写産物が検出されないことから、このマウスが null mutant であることを確認した (図3-2C)。

Mab21l2 欠損マウスの表現型

Mab21l2^{-/-} マウスの致死性を検討するために、*Mab21l2*^{+/-} 同士の交配で得た胚の遺伝子型と生存率を発生段階を追って調べた。生存の是非は心臓の拍動を指標とした。その結果、E10.5 までは *Mab21l2*^{-/-} は正常に生存していたが、E11.5 以降で致死の個体が認められた。E12.5 における致死率は約50%、E13.5 では約65%、E14.5 以降では100%であった (表3-1)。

実体顕微鏡下の観察から、*Mab21l2*^{-/-} 胎仔の形態異常は E10.5 以降で認められた (図3-3A, B)。野生型では E10.5 以降に網膜色素上皮が認められたが、*Mab21l2*^{-/-} では色素細胞は観られなかった (図3-3A', B')。また、*Mab21l2*^{-/-}

では心臓周辺の腹部体壁に形成異常が認められた (図 3-3 B'')。E11.5 において *Mab21l2*^{-/-} では眼の消失が認められた (図 3-3 D')。この時期、野生型では心臓が厚い腹側体壁に覆われるが、*Mab21l2*^{-/-} では腹側体壁が異常に薄く、腹側体壁内部の血管形成にも異常が認められた (図 3-3 D'')。E12.5 において、*Mab21l2*^{-/-} では内臓ヘルニアが観られた (図 3-3 F)。内臓ヘルニアの発症時期には個体差が観られ、E11.5 から E13.5 の間でその割合が増加した。ヘルニアの増加に付随して、心臓停止、および全身に壊死を起こす個体の割合が増加した (data not shown)。以上の結果から *Mab21l2*^{-/-} は眼と腹部体壁の形成異常を起こすことが判明した。また、内臓ヘルニアが生じた結果、致死となることが示唆された。

***Mab21l2* は網膜の発生に必要である**

形態形成における *Mab21l2* の役割を調べるために、*Mab21l2*^{-/-} の眼形成不全に着目し、組織学的解析を行った。眼の源基で *Mab21l2* の発現が始まる E8.5 から E9.0 において、*Mab21l2*^{-/-} に形態的異常は観られなかった (data not shown)。E9.5 において、野生型では眼胞は頭部外胚葉と近接し、水晶体プラコード誘導が起こる (図 3-4 A)。一方 *Mab21l2*^{-/-} では眼胞は形成されるが、頭部外胚葉と近接した領域が、野生型に比べ顕著に小さかった (図 3-4 B)。E10.5 において、*Mab21l2*^{-/-} では眼杯が形成されず、かつ未発達な眼胞と頭部外胚葉は離別していた。また、頭部外胚葉の陥入、および水晶体胞の形成は全く認められなかった (図 3-4 D)。E11.5 において、*Mab21l2*^{-/-} では眼柄様の組織、および網膜様組織と網膜色素上皮様の細胞が認められたが、神経性網膜、および水晶体の形成は全く観られなかった (図 3-4 F)。また、TUNEL 法により眼柄様組織、および網膜様組織周辺に細胞死の増加を確認した (図 3-4 H)。以上の結果から、*Mab21l2* が眼形成過程において、とくに眼胞形成期に重要な役割を果たすことが判明した。

***Mab21l2*^{-/-} 眼胞において、*Chx10* の発現は減少する**

Mab21l2^{-/-} は眼胞形成に異常が認められた。そこで、*Mab21l2*^{-/-} で形成異常が起きる以前の発生段階で、眼胞形成に関連する遺伝子の発現を *Mab21l2* と比較

した。*Rx* と *Pax6* はペアードタイプの本メオドメイン、*Lhx2* は LIM タイプの本メオドメイン、*Otx2* は本メオドメインをコードする転写調節因子であり、*Bmp4* と *Bmp7* は分泌因子である。いずれの遺伝子も眼胞において発現すること、および変異体の解析から、眼胞形成過程で重要な役割を持つことが知られている(Furukawa et al., 1997; Furuta et al., 1997; Grindley et al., 1995; Matsuo et al., 1995; Xu et al., 1993)。15体節期(E9.0)において、*Mab21l2* は背側眼胞で発現が認められた。この時期、*Mab21l1* の発現は *Mab21l2* に比べ弱かった(図3-5)。*Rx* は眼胞特異的に発現が認められた。*Lhx2* と *Otx2* は眼胞を含む前脳に広く発現していた。*Pax6* と *Bmp7* は頭部外胚葉全域と眼胞に弱く発現していた。*Bmp4* はこの時期には発現が弱く、*Mab21l1* と類似した発現様式を示した。これら、眼胞形成に関わることが知られている遺伝子は、いずれも *Mab21l2* と発現領域が重複するが、弱冠異なる発現様式を示した。22体節期(E9.5)において、*Mab21l2* は背側眼胞に限局して発現し、*Mab21l1* は眼胞において *Mab21l2* とは異なる領域に発現が観られた。

Mab21l2^{-/-}の眼胞形成異常をより詳細に理解するために、形態異常が始まる22体節期の *Mab21l2*^{-/-}における上記の眼胞形成関連遺伝子の発現を調べた。その結果、*Rx*, *Lhx2*, *Otx2*, *Bmp7*, *Pax6* はいずれも *Mab21l2*^{-/-}の眼胞で発現しており、野生型と顕著な差は観られなかった(図3-6, data not shown)。これに対し、*Mab21l1* は *Mab21l2*^{-/-}において眼胞、頭部外胚葉共に発現が減少していた。このことから、この時期に *Mab21l2*^{-/-}において何らかの眼胞形成異常が起きていることが示唆された。次に背側眼胞で発現することが知られる *Bmp4*, および腹側眼胞で発現することが知られる *Pax2* の発現を調べた。その結果、*Bmp4* は *Mab21l2*^{-/-}眼胞でも野生型と同様に発現していた。また、*Pax2* も *Mab21l2*^{-/-}眼胞で野生型と同様に腹側で発現が認められた。これに対し、*Chx10* は *Mab21l2*^{-/-}の眼胞で顕著に発現量が減少していた(図3-6)。また、その発現領域は野生型に比べ、より腹側で認められた。*Chx10* はペアードタイプの本メオドメインをコードする転写調節因子であり、予定神経性網膜領域の眼胞に発現することが知られている(Liu et al., 1994)。

神経性網膜形成における *Mab21l2* の重要性

形態異常が顕著に認められたE10.5(33体節期前後)以降における *Mab21l2*^{-/-}

での眼形成関連遺伝子の発現を検討した。*Chx10* は眼の源基において神経性網膜に限局して発現する事が知られている(Liu et al., 1994)。また、*Chx10* に突然変異を持つ *Ocular retardation(or)*変異体は *Chx10* の null allele であり、神経性網膜の細胞増殖が減少することが知られている(Burmeister et al., 1996)。*Mab21l2*^{-/-}において、*Chx10* の発現に顕著な減少が認められた(図3-7B)。これに対し、神経性網膜全域に限局して発現する *Rx* は *Mab21l2*^{-/-}において野生型と同程度の発現が認められた(図3-7D)。この *Rx* 陽性領域は、眼胞に由来する形成不全を起こした眼杯であると考えられた。*Mab21l2*^{-/-}における *Chx10* の発現は、隣接切片で認められる *Rx* 陽性領域の中央から腹側にかけて検出された。一方、*Pax2* は野生型で腹側神経性網膜に発現が観られ、*Mab21l2*^{-/-}においても *Rx* 陽性領域の腹側に発現が認められた(図3-7F)。また、*Bmp4* は野生型で背側神経性網膜に発現が観られ、*Mab21l2*^{-/-}においても *Rx* 陽性領域の背側に発現が認められた(data not shown)。*Bmp4* と同様に、背側神経性網膜に発現が限局する *Tbx5* は、*Mab21l2*^{-/-}の *Rx* 陽性領域において発現が観られなかった(data not shown)。*Tbx5* は *Bmp4* に発現が誘導され、背側神経性網膜の形成に重要な役割を持つことが知られている(Koshiba-Takeuchi et al., 2000)。隣接切片における、BrdU 陽性細胞は、*Mab21l2*^{-/-}の眼杯様組織の背側で減少していた(図3-7H)。この領域は *Rx* 陽性、かつ *Chx10*, *Pax2*, 陰性の領域であった。すなわち、*Mab21l2*^{-/-}において眼杯の形成不全は、*Chx10* の発現量低下に付随する背側神経性網膜の発生異常により引き起こされると考えられた。E11.5 の *Mab21l2*^{-/-}において眼杯様組織の萎縮に伴い *Chx10* の発現は消失した(図3-8E)。また、*Mab21l2*^{-/-}における *Rx* の発現も消失した(data not shown)。一方 E11.5 において、*Mab21l1* の発現は眼杯様組織とその周辺部に認められた(図3-8C)。

PAX6 は *Mab21l2*^{-/-}眼杯様組織において、野生型と同様に発現が認められたが、予定水晶体領域の外胚葉には全く発現が観られなかった(図3-7J)。また、水晶体で特異的に発現する *αA-crystallin*, *Foxe3*, *Pitx3*, *c-maf* の発現は *Mab21l2*^{-/-}の外胚葉において認められなかった(data not shown)。同様に *Mab21l1* の発現も *Mab21l2*^{-/-}外胚葉では認められなかった。このことから、*Mab21l2*^{-/-}において水晶体は形成されないと判断した。

眼柄には *Mab21l2* が発現していたが、*Mab21l1* の発現は観られなかった(図3-8A,B)。このことから、*Mab21l2*^{-/-}眼柄における、形成異常が示唆された。*Mab21l2*^{-/-}は形態異常が著しく、形態から眼柄を識別することは困難であった。

そこで *Mab21l2*^{-/-} における、眼柄の有無を検討するために、*Pax2* と *Vax1* の発現を調べた。*Pax2* はペアードタイプのホメオドメイン、*Vax1* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、ともに眼柄で発現すること、およびノックアウトマウスの解析から眼柄の形成に重要な役割を持つことが知られている (Favor et al., 1996; Hallonet et al., 1999)。その結果、眼柄形成初期の E10.5 と E11.5 いずれにおいても、*Pax2*, *Vax1* 共に *Mab21l2*^{-/-} で発現が認められた (図 3-8 G、data not shown)。

網膜は主に神経性網膜と網膜色素上皮から構成される。*Mab21l2*^{-/-} における網膜色素上皮の有無を検討するために、*TRP2* (tyrosinase-related protein-2) の発現を調べた。*TRP2* は網膜色素細胞特異的に発現する遺伝子で、最も初期に発現することが知られている (Steel et al., 1992)。野生型ではメラニンの蓄積に先だって、30 体節期から *TRP2* の顕著な発現が観られた。一方、*Mab21l2*^{-/-} では 40 体節期 (E10.5) においても *TRP2* の発現は観られなかった (data not shown)。E11.5 においては、*Mab21l2*^{-/-} の形成異常を起こした神経性網膜様組織の周辺に *TRP2* 陽性細胞が認められた (図 3-8 I)。隣接切片の HE 染色像から、*TRP2* 陽性領域にメラニンの蓄積が観察された。しかしながら、野生型に観られる、明瞭な網膜色素上皮細胞層の形成は認められなかった。以上の結果から *Mab21l2*^{-/-} において、網膜色素上皮と眼柄は、関連遺伝子の発現に関する限り発生することが判明した。また、*Mab21l2*^{-/-} に観られる神経性網膜の形成異常が、*Chx10* の発現減少に付随した増殖細胞の減少とこれに続く眼杯の形成異常により起こることが判明した。

Mab21l1/*Mab21l2* 二重欠損マウスの作出

Mab21l2 と *Mab21l1* はアミノ酸配列が 94% の相同性を示すため、生体内で同等の役割を担っていると考えられる。また、*Mab21l1* 遺伝子欠損マウスに見出された表現型はいずれも、*Mab21l1* のみが発現する領域であったことから、*Mab21l1* の欠損は *Mab21l2* により、補償されることが示唆された。*Mab21l2* と *Mab21l1* の生体内における役割をより明確にするために、*Mab21l1*/*Mab21l2* 二重欠損マウスの作出を試みた。マウスゲノムにおいて、*Mab21l1* と *Mab21l2* は共に第三染色体上に存在し、互いに約 10 cM の遺伝学的距離に位置することが知られている (Mariani et al., 1999, Kominami, personal communication)。

そこで、*Mab21l1*^{+/-}と *Mab21l2*^{+/-}を交配し、*Mab21l1/2*^{+/-}二重ヘテロマウスを作出した。ここで得られた二重ヘテロマウスは別の相同染色体上にそれぞれの変異をもつ個体（以下、another allele +/- (aa+/-)と表記）である。aa+/-と野生型を交配し、同一の染色体上に二重遺伝子欠損を持つ個体（以下、same allele +/- (sa+/-)と表記）を得た。sa+/-は遺伝学的距離から予想された通り、約10匹に1匹の割合で得られた。aa+/-, sa+/-マウスは共に正常であった。sa+/-同士を交配し *Mab21l1/2* 二重遺伝子欠損マウス（以下、-/-と表記）の作出を試みた。

その結果、予想に反して-/-マウスは *Mab21l2* 単独のホモ接合体(以下+/+,-/と表記)と同等の表現型を示した。E8.5 から E10.5 にかけて、実体顕微鏡下で見出された形態的異常は+/+,-/と同様、眼と腹部体壁の形成不全のみであった（図3-9）。*Mab21l1/Mab21l2* が共発現する中脳、脊髄、肢芽、鰓弓には形態異常は観られなかった。致死性に関しても、+/+,-/と-/-,-/に顕著な差は観られなかった（表3-2）。しかしながら、sa+/-と+/-,+/+の交配で生じる-/-,+/-の成体マウスは予想される数よりも大幅に少なかった（表3-2）。これに対し、-/-,+/+は予想される頻度で出現し、成体に至るまで生育する（一章、二章参照）。このことから、*Mab21l1* と *Mab21l2* は生体内で類似した機能を持ち、互いの欠損を補償しうることが示唆された。一方、-/-,+/-の出現率は、新生仔の段階では予想されるメンデル比に合致した（表3-2）。よって、直接的な原因は不明であるが、-/-,+/-は出生後の成長過程で死に至ると判断した。

***Mab21l2*^{-/-}マウスにおける腹部体壁形成異常**

実体顕微鏡下の観察から、*Mab21l2*^{-/-}は E11.5~E12.5 において、全ての個体で内蔵ヘルニア、あるいは内蔵ヘルニアに伴う壊死が認められた。そこで、腹側体壁に着目し、組織学的解析を行った。E9~E9.5 において、*Mab21l2*^{-/-}の腹側体壁に顕著な形態異常は観られなかった（data not shown）。E10 の *Mab21l2*^{-/-} 腹側体壁において、体壁を構成する細胞数の減少が認められた（図3-10B）。E12 において、野生型の胸部付近の腹部体壁は細胞が密に並んだ多列様構造が観られた（図3-10C）。一方 *Mab21l2*^{-/-} では体壁を構成する細胞が粗であり、*Mab21l2*^{-/-} の異常な膨潤と共に体腔側上皮構造の乱れが認められた（図3-10D）。また、体壁内部に血管の過形成が認められた。腹部付近の野生型腹側体壁では

厚い間充織が観られたが、*Mab21l2*^{-/-}では間充織の消失と腹側体壁の薄化が認められた(図3-10F)。体壁の薄化に伴い内臓は腹側に膨張し、臍帯付近で体外に露出していた。以上の観察から、*Mab21l2*^{-/-}において、E10以降で腹側体壁の薄化が起こり、薄化した体壁で体腔内圧が支持されず、結果として内臓ヘルニアを引き起こし、致死となると考えられた。

腹側体壁における *Mab21l2* の発現

Mab21l1^{-/-}マウスの表現型、および^{-/-},^{+/-}の致死性の結果から、*Mab21l2* と *Mab21l1* が生体内で類似した機能を持つことが示唆された。そこで、腹側体壁における *Mab21l2* と *Mab21l1* の発現を比較した。*Mab21l2* は E8.5~E9.0 において、腹側体壁、羊膜等で発現が観られた(図3-11A)。腹側体壁形成に関わることが知られる *Bmp4* の発現は *Mab21l2* と若干異なった(図3-11B)。E9.5 になると、腹側体壁、後腸、臍帯源基で強い発現が認められた(図3-11C)。一方、*Mab21l1* の発現はこの時期には腹側体壁周辺では検出されなかった(図3-11D)。E12 において、*Mab21l2* は胸部、腹部、いずれの腹側体壁でも間充織で強く発現していた(図3-11E, G)。これに対し、*Mab21l1* は胸部腹側体壁の間充織で、*Mab21l2* よりも狭い領域で発現していた(図3-11F)。腹部腹側体壁では *Mab21l1* の顕著な発現は観られなかった(図3-11H)。また、*Mab21l2* は中腸、臍動脈の間充織で発現が観られるが、*Mab21l1* は中腸では末梢神経系細胞のみに発現が観られ、臍動脈には発現が観られなかった(図3-11G, H)。

腹側体壁形成における *Mab21l2* の重要性

組織学的解析から、*Mab21l2*^{-/-}の腹側体壁において形態異常を伴う細胞数の減少が認められた。*sa*^{-/-}においても同様の異常が認められた。そこで、形態異常が観られ始める E10.5 で、*Mab21l2*^{-/-}、および *sa*^{-/-}における細胞周期関連遺伝子の発現を調べた。*D-type cyclin* は細胞周期の進行に重要な因子であり、PDGF シグナルは細胞増殖を亢進することが知られている(Heldin et al., 1998; Sherr, 1995; Zhang, 1999)。*cyclinD1*, *cyclinD2* は共に *sa*^{-/-}腹側体壁で、野生型と同様に発現していた(図3-12A, B)。一方、PDGF 受容体(*PDGF Re*)は野生型では

腹側体壁全域に発現が観られたが、*sa*^{-/-}では発現領域の限局と共に、発現量が減少していた(図3-12C,D)。*Mab21l2*^{-/-}においても、*sa*^{-/-}と同様の結果を得た(data not shown)。

次に、*Mab21l2* の役割をより詳細に理解するために、腹側体壁形成に関連する遺伝子の発現を調べた。*Alx4* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、頭部、および腹部の間充織に広く発現することが知られている(Hudson et al., 1998)。また、*Alx4/Cart1* 二重欠損マウスは、腹側体壁の形成異常とそれに伴う胸骨の形成異常を示すことが知られている(Qu et al., 1999)。*Bmp* は腹側体壁で発現し、肋骨形成に関係することが知られている(Luo et al., 1995; Paine-Saunders et al., 2000; Sudo et al., 2001)。*Msx1/Msx2* はホメオドメインをコードする転写調節因子であり、*Bmp4* によりその発現が誘導されることが知られている(Zhang et al., 2002)。*sa*^{-/-}において、*Alx4* は腹側体壁では発現が減少していた(図3-12F)。一方、鰓弓での発現に変化は観られなかった。*Bmp4* もまた、*Mab21l2*^{-/-}腹側体壁で発現が減少していた(図3-12H)。動脈幹における *Bmp4* の発現は、*sa*^{-/-}で野生型と同様に発現していた。*Alx3* と *Msx1/Msx2* の発現も腹側体壁で減少が観られ、鰓弓や頭部の間充織では発現に変化は観られなかった(図3-12J, data not shown)。*Mab21l2*^{-/-}においても、*sa*^{-/-}と同様の結果を得た(data not shown)。

以上の結果から、*sa*^{-/-}及び *Mab21l2*^{-/-}は E10.5 以降の腹側体壁で、*PDGFR α* の発現量が低下し、細胞増殖に異常が生じることが示唆された。加えて、*Alx3/Alx4*, *Msx1/Msx2*, *Bmp4* の発現低下により腹側体壁の形成不全が起きると考えられた。

3-4 考察

Mab21l2^{-/-}の眼形成異常

Mab21l2 は眼胞形成初期から眼源基で発現するのに対し、*Mab21l1* は遅れて眼胞と頭部外胚葉に発現する。この発現時期の違いから、*Mab21l2*^{-/-}に眼形成異常が生じると考えられる。形態的判断から、*Mab21l2*^{-/-}では眼胞は形成されるが、その後眼杯の形成不全に続き、顕著な形態形成異常が観られる。しかしながら、*TRP2* 陽性細胞が観られることから、*Mab21l2*^{-/-}で網膜色素細胞の分化は正常に起こると判断される。網膜色素細胞層には *Mab21l1* が発現することから、*Mab21l2* の欠損が *Mab21l1* により補償されると考えられる。また、予定眼柄領域で *Pax2* の発現が観られることから、*Mab21l2*^{-/-}において眼柄の形成は起こりうると判断する。眼柄に形成異常を起こす *Pax2* 欠損マウス、および *Vax1* 欠損マウスにおいて、眼柄で *Pax6* と *Rx* が異所的に発現誘導されることが知られている (Bertuzzi et al., 1999; Favor et al., 1996; Hallonet et al., 1999)。すなわち、眼柄において *Pax2* と *Vax1* は共に *Pax6* と *Rx* の発現を抑制すると考えられている。*Mab21l2*^{-/-} の *Vax1* と *Pax2* 陽性領域において、*Pax6* と *Rx* の異所的な発現は起こらず、このことから眼柄の形成が支持される。一方、*c-maf*, *Foxe3*, *Pitx3*, *αA-crystallin* 等の水晶体形成関連遺伝子の発現は *Mab21l2*^{-/-}では全く観られないことから、*Mab21l2*^{-/-}では水晶体は形成されないと判断する。

以上の知見から、*Mab21l2* は網膜色素細胞の分化、および眼柄形成には不可欠では無いと結論する。水晶体の欠損、および網膜色素上皮と眼柄の形態異常は眼杯形成不全の二次的影響により生じると考えられる。

眼杯形成における *Mab21l2* の役割

Mab21l2^{-/-} の眼杯形成不全の要因は、以下の3段階のどこかで異常が生じ引き起こされると考えられる。第一に、眼胞が網膜源基としての性質獲得する、第二に、網膜源基細胞が増殖する、第三に、網膜源基細胞が成熟し、眼杯の形態形成が起こる。これらの各段階に重要な働きを担う因子として *Rx*, *Lhx2*, *Pax6* が知られている (Grindley et al., 1995; Mathers et al., 1997; Porter et al., 1997; Zhang et al., 2000)。*Rx* は眼胞形成以前の頭部神経板から発現し、眼胞形成後、眼胞に

発現が限局することが知られている(Furukawa et al., 1997)。また、*Rx*^{-/-}マウスは眼溝形成が全く起こらず、*Pax6*, *Six3*, *Otx2* の発現が予定眼胞領域で減少するため、網膜源基形成の最も初期に働く遺伝子であると考えられている(Zhang et al., 2000)。*Lhx2* ノックアウトマウスは、眼胞形成は起こるが、その後の眼胞の生長が停止することが知られている(Porter et al., 1997)。また、*Lhx2*^{-/-}の眼胞において、*Pax6* の発現は正常であることが示されている(Porter et al., 1997)。*Pax6* 変異体である *Sey/Sey* では、眼胞は形成されるが、細胞増殖と分化両方に異常が生じ眼杯の形成不全が起きることが知られている(Grindley et al., 1995)。

本研究により *Rx*^{-/-}, *Lhx2*^{-/-}, *Sey* と *Mab2112*^{-/-} の表現型の類似性が示されたが、*Mab2112*^{-/-} における *Rx*, *Lhx2*, *Pax6* の正常な発現、加えて、背側眼胞、腹側眼胞にそれぞれ発現することが知られる *Bmp4* および *Pax2* と *Vax1* の正常な発現が確認された。このことから、*Mab2112*^{-/-} の眼胞が網膜源基としての性質を保持することが支持される。一方、本研究二章で *Sey/Sey* において *Mab2112* の発現は変化しないことが示されている。このことは、*Mab2112* が *Pax6* と異なる遺伝学的経路に位置することを示唆する。*Rx* は *Mab2112* より初期に発現が始まり、*Rx*^{-/-} の形成異常が *Mab2112* に比べ初期に生じることから、*Mab2112* の遺伝学的上流に位置すると予想される。*Lhx2*^{-/-} と *Mab2112*^{-/-} は、知られている変異体で最も類似した表現型を示し、かつ *Lhx2*^{-/-} は *Mab2112*^{-/-} と同様に *Pax6* の発現が変化しないことが示されている。また、*Lhx2* は *Sey/Sey* で発現が変化しないことも示されており、*Mab2112* と同様 *Pax6* 非依存的な遺伝学的経路で働くことが示唆されている(Porter et al., 1997)。加えて *Lhx2*^{-/-} は中枢神経系で細胞増殖異常が示されており、本研究で示した *Mab2112*^{-/-} の眼杯様組織における BrdU の取り込み減少との類似性が伺える(Porter et al., 1997)。これらの知見は *Lhx2* と *Mab2112* が眼胞形成過程で共通の役割を持つことを示唆するが、直接的な関係、および同一の遺伝学的経路に位置するかどうかは判断できない。*Lhx2*^{-/-} における *Mab2112* の発現を調べることで、両遺伝子の関係が明確になるものと考えられる。

Chx10 は神経性網膜源基の細胞増殖制御に重要な役割を果たすことが知られている(Burmeister et al., 1996)。*Chx10* null 変異体では *cyclinD1* の発現減少と *cyclinD1* の抑制因子である p27^{Kip1} 陽性細胞数が増加することが示され、その結果、神経性網膜の細胞増殖が低下すると考えられている(Green et al., 2003)。*Mab2112*^{-/-} における *Chx10* の発現減少と、それに附随する BrdU の取り込み減

少から、*Mab2112*^{-/-}の眼杯形成不全は神経性網膜源基細胞の増殖不全により引き起こされると考えられる。また、本研究第二章で水晶体プラコードの細胞増殖に *Mab2111* が必要なことが示されたが、*Mab2111* の発現も *Mab2112*^{-/-}で減少しており、このことから、*Mab2112*^{-/-}における細胞増殖不全が支持される。さらに、眼杯形成不全に続く眼杯様組織背側における *Bmp4* の発現減少と、本来 *Bmp4* により発現が誘導される *Tbx5* の発現消失から、*Mab2112*^{-/-}の眼杯は形態異常のみならず、眼杯としての性質も欠損すると考えられる。従って、*Mab2112* は眼胞形成以降の眼杯形成過程において、神経性網膜源基細胞の増殖と成熟に必要な不可欠であると結論する。

眼杯形成過程において背側眼胞は、腹側眼胞領域のより盛んな生長により押し出されるように背側に移動することが知られている(Kondo, 2002)。*Mab2112*^{-/-}において、背側眼胞 (*Rx* 陽性、*Pax2*, *Chx10* 陰性の領域) が細胞増殖不全を伴って発生を停止し、背側への移動が阻害されるのに対し、予定眼杯領域の腹側 (*Rx*, *Pax2*, *Chx10* 陽性領域) では正常に発生が進み、不完全な陥入が腹側のみで起こると考えられ、その結果このような形態の眼杯形成異常が生じると推察される。

腹側体壁における *Mab2112* の役割

腹側体壁は表皮、および somatopleural mesoderm に由来する間充織と paraxial mesoderm 由来の細胞から構成される(Brent and Tabin, 2002; Sadler, 2000)。肋骨、骨格筋は共に paraxial mesoderm から発生する somite 由来の細胞から発生することが知られているが、somite から派生する sclerotome, myotome, dermomyotome の内、どの組織が肋骨源基、骨格筋源基を形成するのか、またどのように細胞運命が決められるのかは不明な点が多い(Huang et al., 2000; Kato and Aoyama, 1998)。*Pax3*, *MRF4/myf6*, *myf5*, *Myogenine* のノックアウトマウスは肋骨形成異常を示すことが知られるが、これらの遺伝子はいずれも myotome あるいは dermomyotome に限局して発現する(Henderson et al., 1999; Vivian et al., 2000)。また、*PDGFR α* は sclerotome に限局して発現し、myotome には発現しないが、そのノックアウトマウスは sclerotome は正常だが myotome の形成異常を起こすことが知られている(Soriano, 1997)。さらに、組織片の移植実験の結果から、肋骨の形成には sclerotome と dermomyotome 両方が必要であることが示されてい

る(Huang et al., 2000; Kato and Aoyama, 1998)。これらの知見から、sclerotome と myotome が相互作用しつつ lateral plate mesoderm に侵入して腹側体壁が形成され、その後、肋骨、および腹側骨格筋が形成されると考えられる。しかしながら、腹側体壁に移動する細胞の実体は未同定であり、移動後に細胞運命の決定と増殖が起こるのか、あらかじめ運命決定された細胞が移動後に増殖し体壁の肥厚が起こるのかは不明である。

Mab21l2 は *Pax3/PDGFa* 陽性の myotemo では発現が認められず、より片縁側の間充織と腹側体壁の間充織で発現する。これらの領域で *Mab21l1* の発現は *Mab21l2* に比べ顕著に少ない。そのため、*Mab21l2*-/-において、腹側体壁の形成異常が起こると考えられる。筆者は *Mab21l2*-/-において、myotome に発現することが知られる *Pax3*, および *PDGFa* は正常に発現することを確認した(data not shown)。したがって、腹壁形成異常は myotome の発生異常によるものでなく、腹壁自体の肥厚が起こらないために生じると考えられる。

Mab21l2-/-腹側体壁における *PDGF Re* の発現減少は細胞増殖不全を示唆するものであり、体壁肥厚不全の一要因であると考えられる。*PDGF* シグナルは培養細胞を用いた解析から細胞増殖を亢進する役割が知られ(Heldin et al., 1998; Luo and Miller, 1999)、*PDGF Re* ノックアウトマウスは顔面、骨形成異常に加え胎生致死性を示すことから、生体内で重要な役割を持つと考えられている(Morrison-Graham et al., 1992; Soriano, 1997)。しかしながら、生体内における役割は明らかにされておらず、最近報告されたコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、*PDGF Re* は細胞増殖、生存、細胞移動ではなく、むしろ細胞の分化過程で重要な役割を持つことが示唆されている(Tallquist MD and Soriano P, 2003)。このことは、*Mab21l2*-/-腹側体壁形成異常が、顕著な細胞増殖不全、および細胞死の増加を示さないことと矛盾しない。一方、*PDGF Re* はキメラマウスの解析から、神経提細胞で細胞自律的に働くことが示されている(Tallquist MD and Soriano P, 2003)。*Mab21l2* は、そのアミノ酸配列の相同性から *Mab21l1* と同等の機能を持つと考えられ、*Mab21l1* と同様に細胞自律的な役割を持つと予想される。このことから、*Mab21l2* は腹側体壁において *PDGF Re* の発現制御を介し、腹壁形成において細胞自律的な役割を持つことが推測される。

D-type cyclin は D1, D2, D3 の3種類が知られ、CDK4/6 を活性化することで G1 期から S 期への進行を促進し、細胞周期を制御すると考えられている(Sherr,

1995; Zhang, 1999)。p57^{Kip2}はCDK阻害分子でありCDK/cyclinD複合体に結合し、その活性を阻害し、細胞周期の進行を抑制すると考えられている(Harper and Elledge, 1996)。cyclinD1のノックアウトマウスは体重減少に加え、網膜に細胞増殖不全が起こることが知られている(Fantl et al., 1995)。また、p57^{Kip2}のノックアウトマウスは腹側体壁形成異常、および臍帯ヘルニアを起こすことから(Zhang et al., 1997)、腹側体壁形成とD-type cyclinの関連が示唆される。しかしながら、cyclinD1, cyclinD2共にMab2112-/-では腹側体壁のみならず、網膜においても正常に発現していた。また、p57^{Kip2}と類似した機能を持つと考えられるp27^{Kip1}(Zhang et al., 1998)の発現も変化していなかった(data not shown)。このことから、Mab2112-/-の体壁形成異常はcyclin非依存的な要因により引き起こされると考えられる。以下の理由により、本研究では調べなかったcyclin D3と腹側体壁形成異常との関連性は少ないと考えられる。最近、3種類あるD-type cyclinの内、2種類を欠損させたノックアウトマウスの解析から、D-type cyclinは他のDタイプのcyclinが欠損した場合、本来は発現しない領域でも異所的に発現が誘導され、機能的相補性により表現型が回復すること明かとなった(Ciemerych et al., 2002)。このことから、Mab2112-/-腹側体壁においてcyclin D3が発現減少したとしても、cyclin D2/D1により、D3の欠損は補償されると考えられる。したがって、Mab2112-/-の腹側体壁形成不全はいずれにしろD-type cyclin非依存的であると推察される。

Mab2112-/-と類似した腹側体壁形成不全を示す変異体として、Hoxb2, およびHoxb4ノックアウトマウスが挙げられる(Barrow and Capecchi, 1996; Manley et al., 2001; Ramirez-Solis et al., 1993)。もっとも顕著な異常が観られるHoxb4^{polIII}において、Alx4/Alx3の発現減少が示され、その結果体壁の肥厚不全が起きると考えられている(Manley et al., 2001)。Alx3/Alx4/Cart1はaristalessファミリーのホメオドメインをコードする転写調節因子であり、腹側体壁、鰓弓、肢芽等の間充織に広く発現することが知られている(Hudson et al., 1998; ten Berge et al., 1998)。Alx4/Cart1二重欠損マウスは胸骨の形成異常を示すため、腹側体壁形成との関連が示唆される(Qu et al., 1999)。本研究により、Mab2112-/-腹側体壁において、Alx4/Alx3/Cart1の発現減少が示された。この結果は、Hoxb4とMab2112が腹側体壁形成過程で同一の遺伝学的経路で働く可能性を示唆するものである。Hoxb4^{polIII}はHoxb4を欠損しneo耐性遺伝子にRNA polymeraseIIプロモーターを付加したalleleである(Manley et al., 2001)。これに対し、neo耐性遺伝子を除い

た allele である *Hoxb4^{loxP}* は体壁形成異常を示さない。両 allele の表現型の違いから、*Hoxb4^{poll}* に含まれるプロモーターが近傍の他の *Hoxb* 遺伝子の発現に影響を与え、複合的な *Hoxb* 遺伝子の異常が生じると考えられている (Manley et al., 2001)。また、*Hoxb1~Hoxb9* を全て欠損する allele である *HoxbΔ* と *Hoxb4^{poll}*、および *Hoxb2-/-* は類似した表現型を示すことから、腹側体壁の形成異常は *Hoxb4* 単独の欠損ではなく、*Hoxb2/Hoxb4* 両方、あるいはさらに複数の *Hoxb* 遺伝子の欠損に起因すると考えられている (Manley et al., 2001; Medina-Martinez et al., 2000)。一方、筆者は *Mab21l2-/-* 腹側体壁において、*Hoxb2/b3/b4* の発現は変化しないことを確認した (data not shown)。したがって、腹側体壁形成過程で *Mab21l2* は *Hoxb* 遺伝子の遺伝学的下流に位置することが推察される。*Mab21l2* が *Hoxb* により発現誘導される標的遺伝子ならば、*Mab21l2* の表現型は *Hoxb4^{poll}/HoxbΔ* と同程度かそれよりも軽度になると考えられる。しかしながら、*Hoxb4^{poll}* では E15.5 以降から内臓ヘルニアによる胎生致死個体が観られ、致死の Penetrance は 36% であり (Manley et al., 2001)、この表現型は *Mab21l2* と比較して軽度である。このことから、*Mab21l2* は *Hoxb* 以外の因子により発現制御されること、あるいは *Hoxb* 非依存的な経路でも働くことが示唆される。*Mab21l2-/-* における *Bmp4* の発現減少は *Mab21l2* と *Bmp4* が同一の遺伝学的経路で働く可能性を示唆する。*Bmp4* により発現が誘導されることが知られる *Msx2* もまた *Mab21l2-/-* 腹側体壁で発現が減少し、このことから *Mab21l2* と *Bmp4* の関連が支持される。BMP の抑制因子である *noggin* で BMP シグナルを異所的に阻害すると、肋骨形成に異常が生じることが知られている (Sudo et al., 2001)。したがって、*Mab21l2* は前述した *PDGF Re*, *Alx3/Alx4/Cart1* に加え *Bmp* を介して腹側体壁形成に必要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、異なるクラスターに属する *Hox* 遺伝子産物が、共通の標的遺伝子を発現制御する例が知られており、*Mab21l2* が腹側体壁で複数の *Hox* により発現制御される可能性が考えられる。すなわち、*Hoxb4^{poll}* は *Hoxb* 以外のクラスターに属する *Hox* 遺伝子により補償され、*Mab21l2* の発現が残存するため *Mab21l2-/-* に比べ軽度の表現型を示す可能性が考えられる。*Hoxb4^{poll}* および *HoxbΔ*, *Hoxb2-/-* における *Mab21l2* の発現を調べることで、*Hox* 遺伝子と *Mab21l2* の遺伝学的関係が明確になると考えられる。

Mab21l2 と *Mab21l1* の機能的類似性

Mab2111^{-/-}、および *Mab2112*^{-/-} の形態形成異常は、いずれも両遺伝子が単独で発現する領域で認められ、*Mab2111* と *Mab2112* はアミノ酸配列が94%の相同性を示すことから両分子は生体内で類似した機能を持つことが強く示唆される。*Mab2111*^{-/-} と *Mab2112*^{-/-} の表現型の違いは機能の違いによるものではなく、発現領域、時期の違いに起因すると推測される。機能的類似性は *Mab2111* と *Mab2112* の ORF を置き換えたノックインマウスの作出により検討できると考えられ、両分子の機能が同等ならば表現型が回復すると予想される。また、*Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損マウスの表現型がそれぞれの単独欠損マウスに比べ重度であれば、間接的に両遺伝子の機能的類似性が証明されると考えられる。しかしながら、*Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損マウスは両遺伝子が重複して発現する鰓弓、肢芽、中枢神経系に形態異常が見い出されず、*Mab2112* 単独欠損マウスと同様な表現型を示す。*Alx3*/*Alx4*/*Cart1*, *Bmp4*, *Msx1*/*Msx2*, *PDGF Re* は腹側体壁で発現減少するが、鰓弓、肢芽では正常に発現し、このことから、これらの組織に顕著な異常は見い出されず、*Mab2112*^{-/-} と二重欠損マウスの差は検出されない(data not shown)。鰓弓、肢芽において *Mab2111*/*Mab2112* は発生段階の後期で機能するとも考えられるが、*Mab2112*^{-/-}、および二重欠損マウスは胎生致死となるため、解析が困難である。*Mab2112* の腹側体壁での発現を規定する調節領域を同定した後、その発現調節領域を用いて腹側体壁でのみ *Mab2112* を発現するトランスジェニックマウスを作製することで、胎生致死の問題は回避されると推測され、鰓弓、肢芽における *Mab2111*/*Mab2112* の役割は解析可能であると考えられる。

最近ヒトに続きマウスでも全ゲノム DNA 配列が公開されたが、*Mab2111*/*Mab2112* と DNA 配列、およびアミノ酸配列が相同性を示すものは見い出されず、*Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損マウスが未知の *mab-21* ファミリー (*Mab2113*?) により補償されるとは考えにくい。したがって *Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損マウスは脊椎動物における *mab-21* の役割を正確に反映するものであると考えられる。しかしながら、機能的類似性を示す分子の存在は否定できず、そのような分子により *Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損が補償されるため、*Mab2111*/*Mab2112* 二重欠損マウスの表現型が軽度になる可能性も考えられる。

二重欠損マウスで鰓弓、肢芽の生長が正常に起こること、およびこれらの組織で細胞増殖、細胞死に異常が観られないことは、*Mab2111*/*Mab2112* の役割がそれ以外の細胞機能にあることを示唆するものである。*Mab2111*^{-/-} と *Mab2112*^{-/-}

1-で観られる水晶体プラコード、および眼杯の細胞増殖不全は *Mab21l1/Mab21l2* の欠損により直接起こるのか、未知の細胞機能障害の二次的影響として検出されるのかは判断できない。筆者はノックアウトマウスの解析により、*Mab21l1/Mab21l2* が発生過程で重要な役割を担うことを明らかにし、加えて MAB21L1/MAB21L2 が細胞自律的に作用することを示唆したが、細胞機能に対する役割は依然として不明である。*Mab21l1/Mab21l2* の役割を解明するためには、MAB21L1/MAB21L2 の分子機能の理解が必要不可欠である。

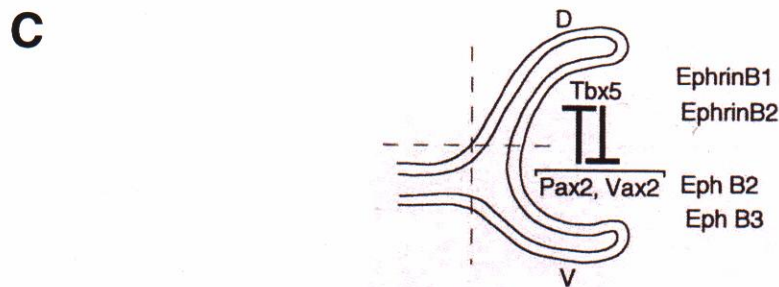
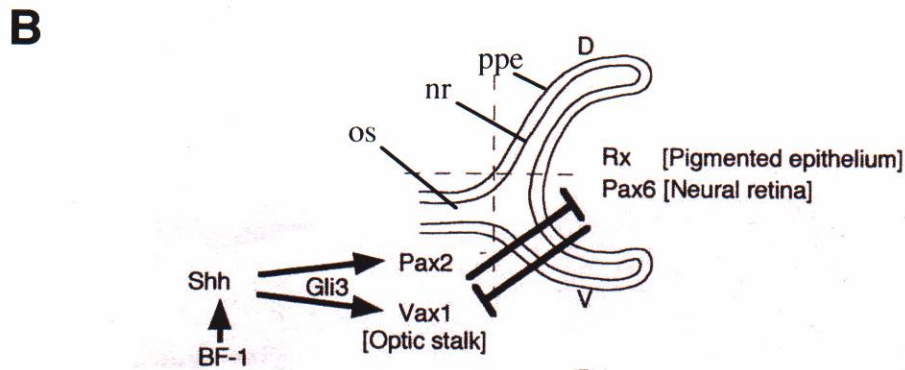
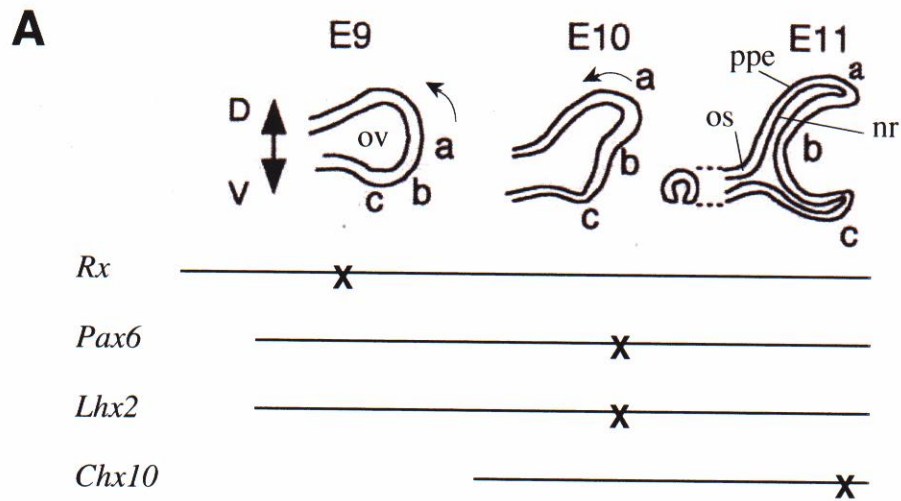
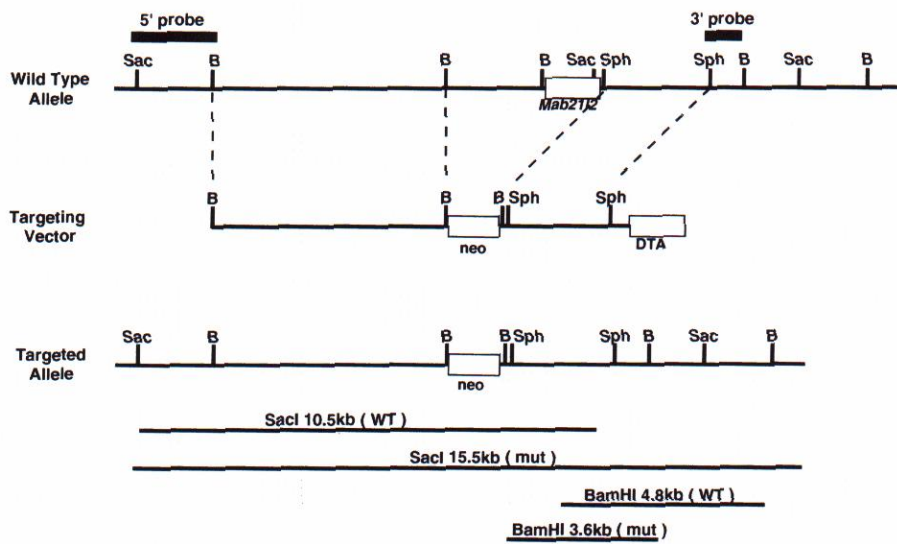


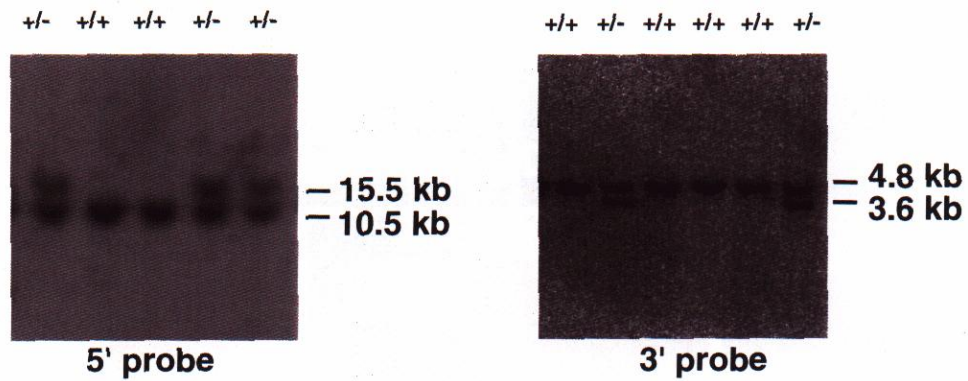
図3—1 脊椎動物の網膜発生

(A) (上) 初期網膜形成過程の模式図。E9, 眼胞形成初期、E10, 眼胞形成後期、E11, 眼杯形成期。眼胞の領域をa, b, cで示した。矢印で領域の移動を示した。(下) 関連遺伝子の発現を直線で示した。ノックアウトマウス、変異体マウスの解析から推測されるその遺伝子の機能時期をXで示した。(B) 神経性網膜と眼柄の形成と関連遺伝子 (C) 神経性網膜の背腹軸形成と関連遺伝子。ov, 眼胞; ppe, 予定網膜色素上皮; os, 眼柄; nr, 神経性網膜; D, 背側; V, 腹側 (Kondo, 2002を改変)

A



B



C



図 3—2 *Mab21l2*欠損マウスの作製

(A)野生型*Mab21l2*ゲノム、ターゲッティングベクター、遺伝子欠損型ゲノムの制限酵素地図。(B)サザンブロットによるGenotyping。(左) SacI処理後のサンプルを5'側プローブで検出したもの。野生型は10.5 kb, 欠損型は15.5 kbのバンドとして検出された。(右) BamHI処理後のサンプルを3'側プローブで検出したもの。野生型は4.8 kb, 欠損型は3.6 kbのバンドとして検出された。(C)*Mab21l2*のwhole mount in situ hybridization。E10.5 *Mab21l2*^{-/-}胚ではシグナルが検出されなかった。

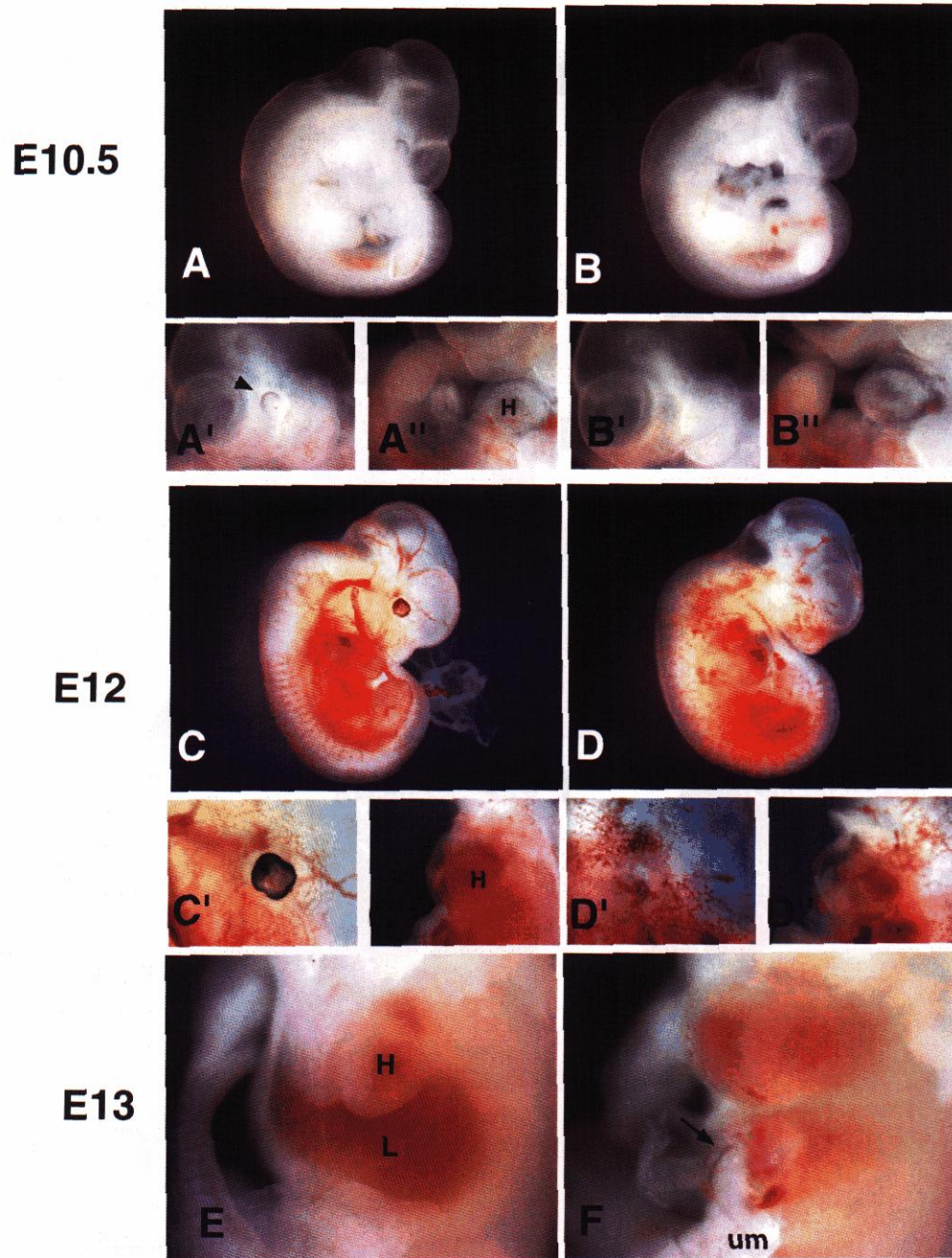


図3—3 *Mab21l2*欠損マウスにおける眼形成異常と腹側体壁形成異常 (A, B)E10.5。(C, D)E11.5。(E, F)E12.5。(A', B')E10.5頭部。(A'', B'')E10.5腹部。(C', D')E11.5眼。(C'', D'')E11.5腹部。(A, C, E) *Mab21l2*^{+/+}。(B, D, F) *Mab21l2*^{-/-}。E10.5 *Mab21l2*^{+/+}では網膜色素上皮が観られるのに対し(A', 矢印)、*Mab21l2*^{-/-}では認められなかった(B')。この時期、腹側体壁に顕著な異常は認められなかった(A'', B'')。E11.5 *Mab21l2*^{-/-}は腹側体壁が薄く心臓が透けて見えた(D'')。E12.5 *Mab21l2*^{-/-}で内臓ヘルニアが認められた(F, 矢印)。H, 心臓; L, 肝臓; um, 臍帯。

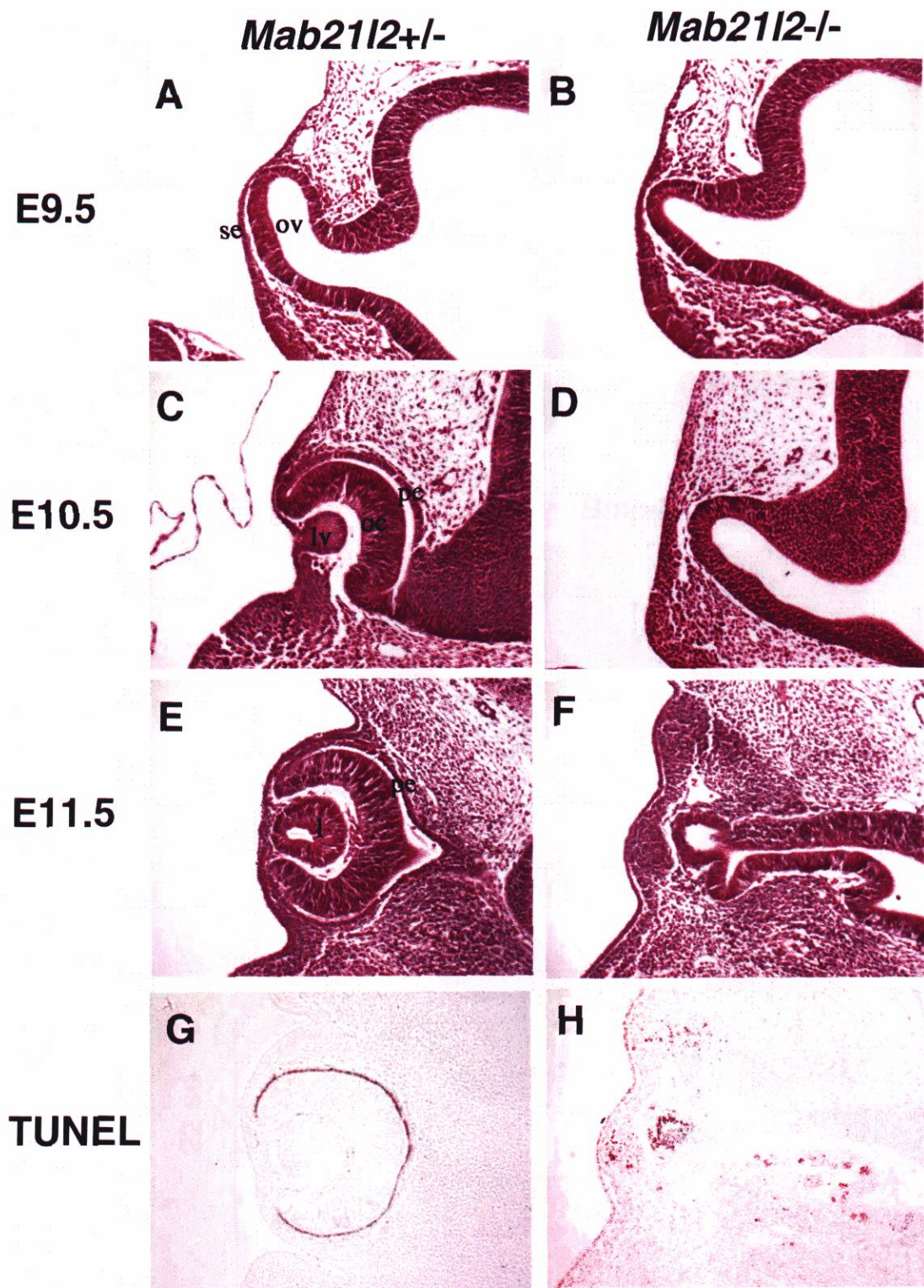


図3—4 *Mab21l2*欠損マウスにおける網膜形成異常
 (A, C, E, G)*Mab21l2*^{+/-}。(B, D, F, H)*Mab21l2*^{-/-}。(A-F)HE染色像。
 (G, H) TUNEL法(DAB発色)。E11.5 *Mab21l2*^{-/-}でTUNEL陽性細胞が増加していた。
 ov, 眼胞; oc, 眼杯; lv, ;l, 水晶体; nr, 神経性網膜; pe, 網膜色素上皮; se, 頭部外胚葉

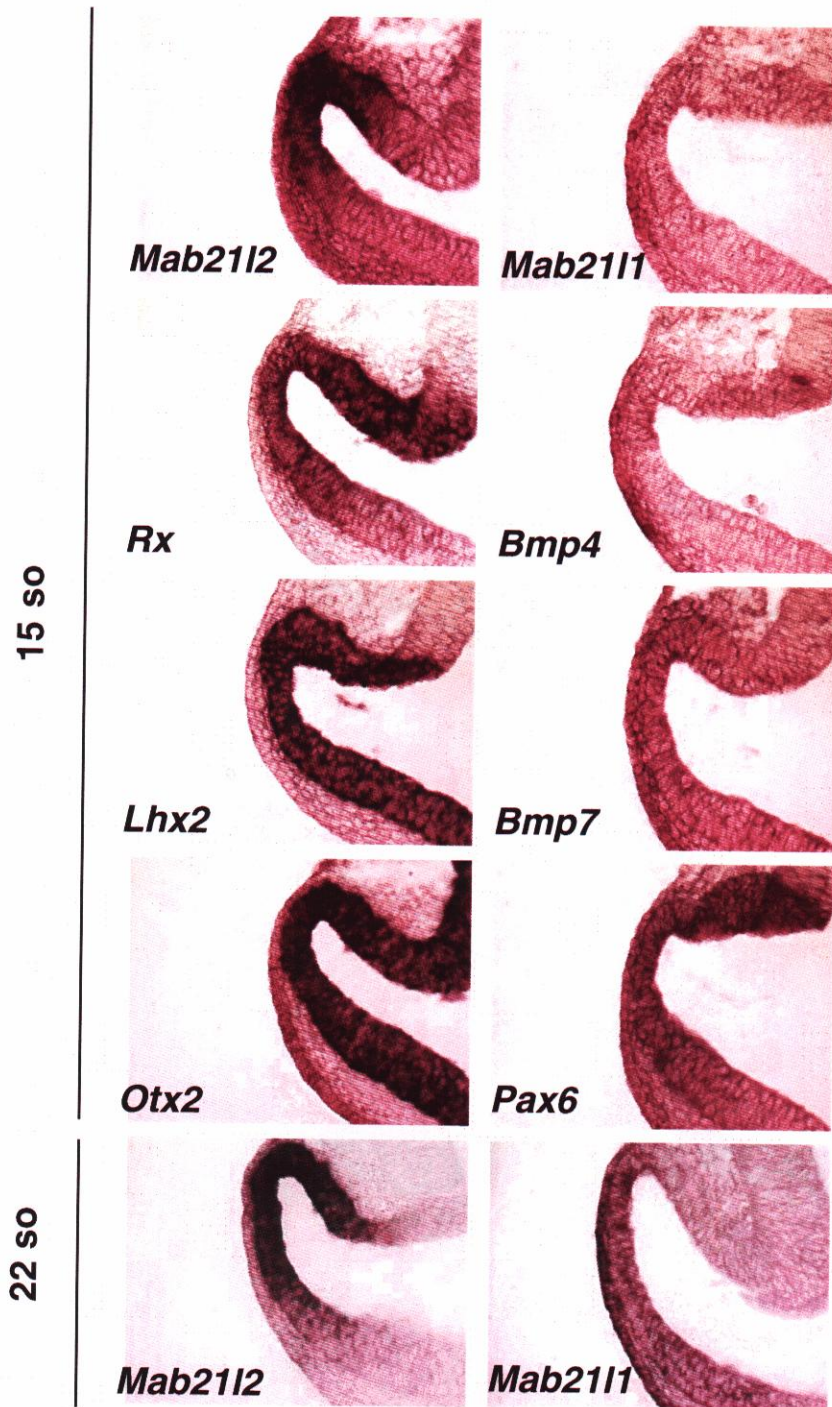


図3—5 眼胞形成過程における*Mab21l2*と網膜形成関連遺伝子の発現

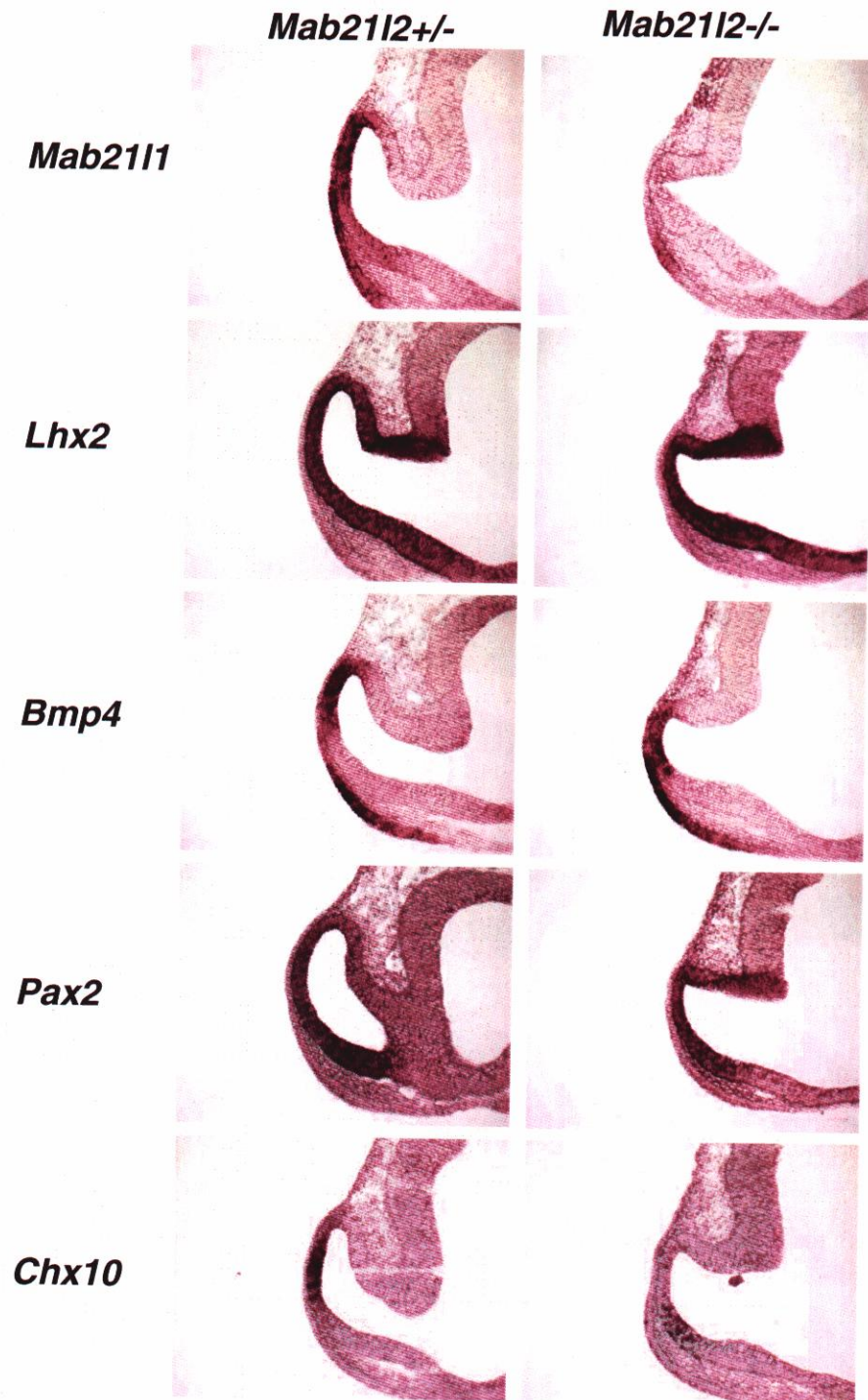


図3—6 22体節期*Mab21l2*欠損マウスにおける網膜形成関連遺伝子の発現

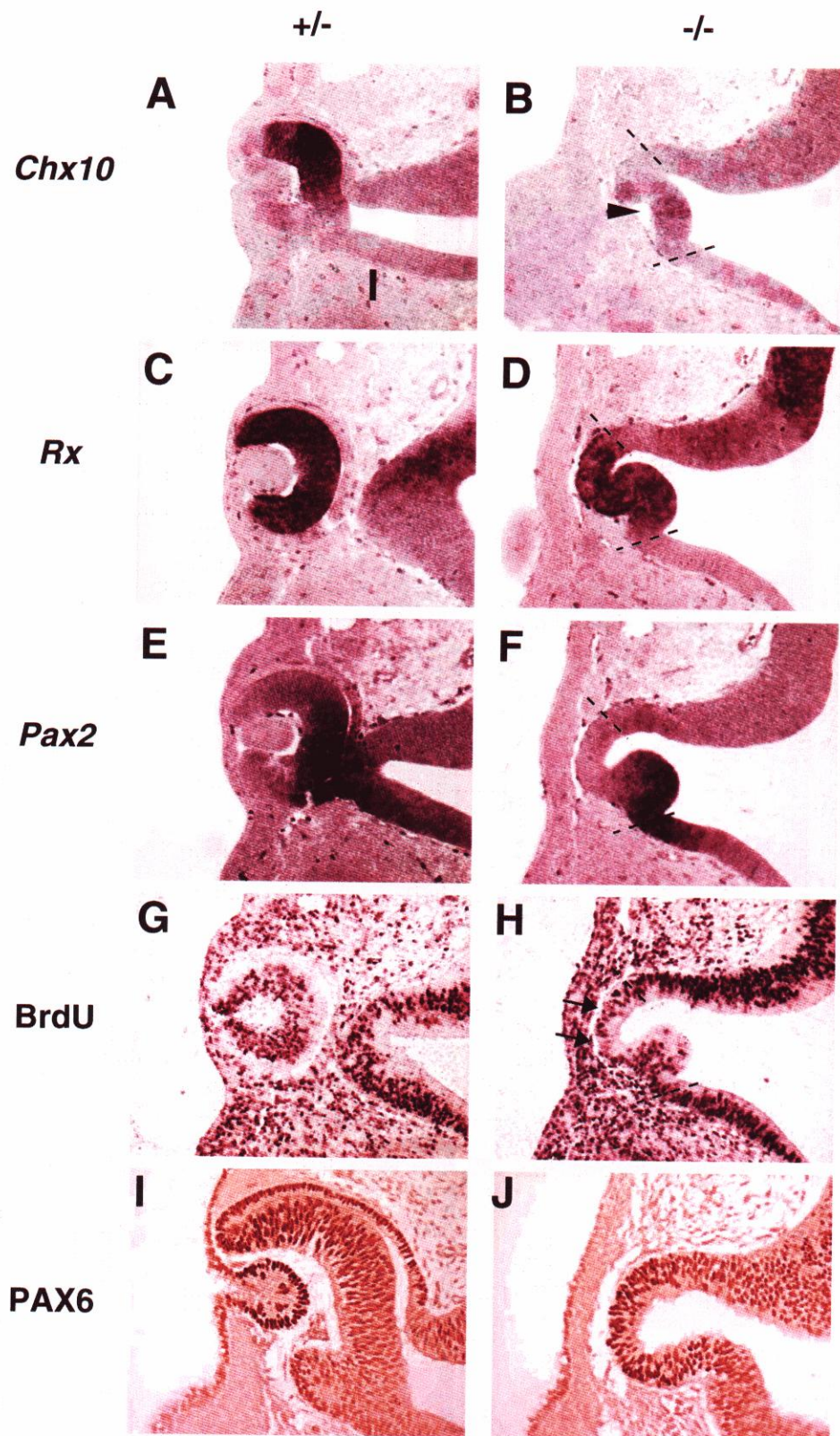


図3—7 *Mab21l2*欠損マウスにおける網膜形成関連遺伝子の発現 (A-H) 4 0 体節期。(I, J) 3 3 体節期。(A-F) in situ hybridization。(G, H) BrdU免疫染色像。(I, J) PAX6免疫染色像。Rx陽性領域を点線で示した。*Mab21l2*^{-/-}で*Chx10*の発現減少(矢尻)、およびBrdUの取り込み減少(矢印)が認められた。

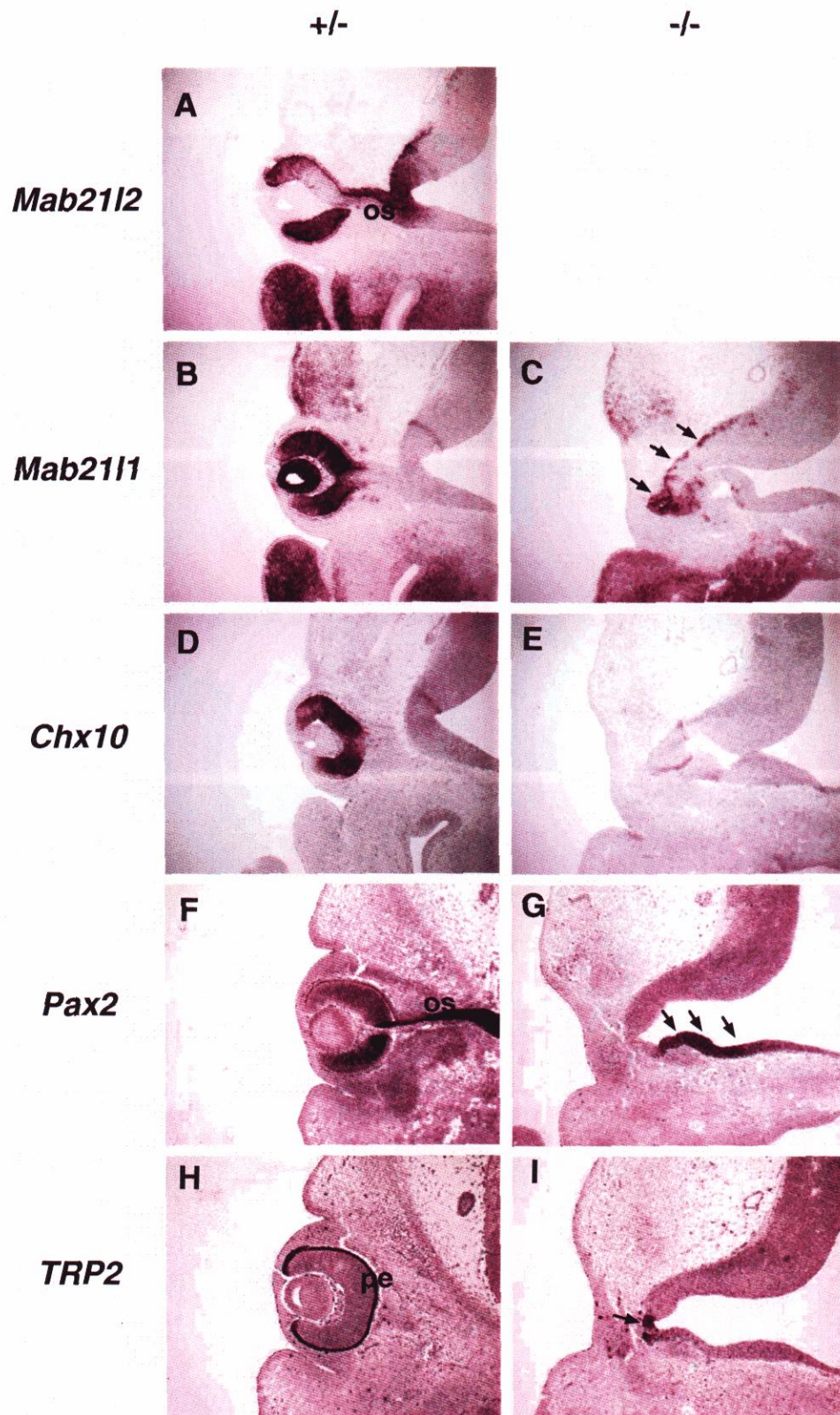


図3—8 *Mab21l2*欠損マウスにおける網膜形成関連遺伝子の発現 (A-E) E11.5。 (F-I) E12.5。 全てin situ hybridization。 *Mab21l2*^{-/-}において、*Mab21l1*, *TRP2*, *Pax2*陽性であった (C, G, I, 矢印) が、*Chx10*は全く検出されなかった(E)。 os, 眼柄; pe, 網膜色素上皮。

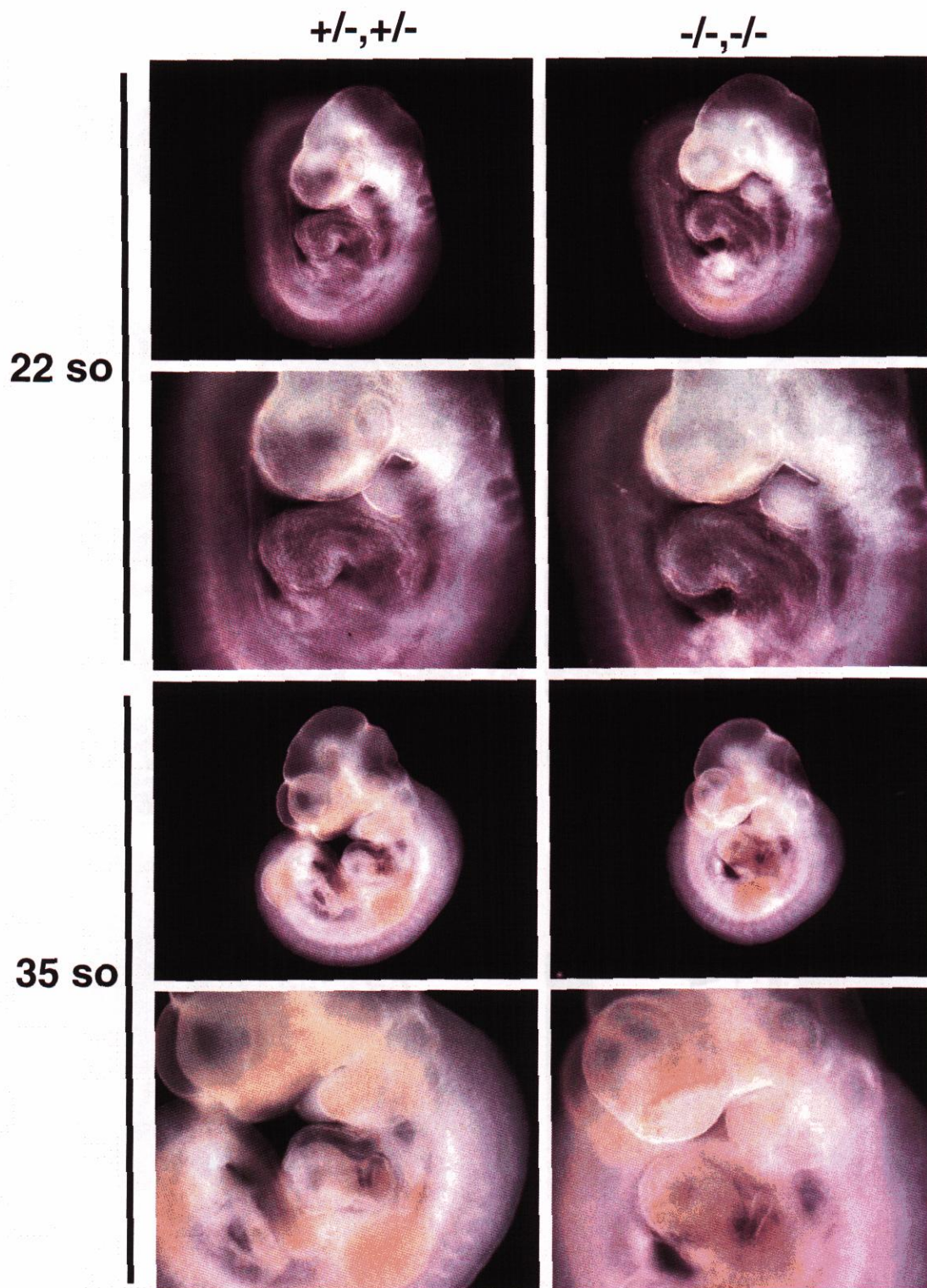


図3—9 *Mab2111/Mab2112*二重欠損マウスの表現型
*Mab2111/Mab2112*二重欠損マウスは*Mab2112*単独の欠損マウス
 と同等の表現型を示した。22体節期では顕著な形態異常は
 認められなかった。

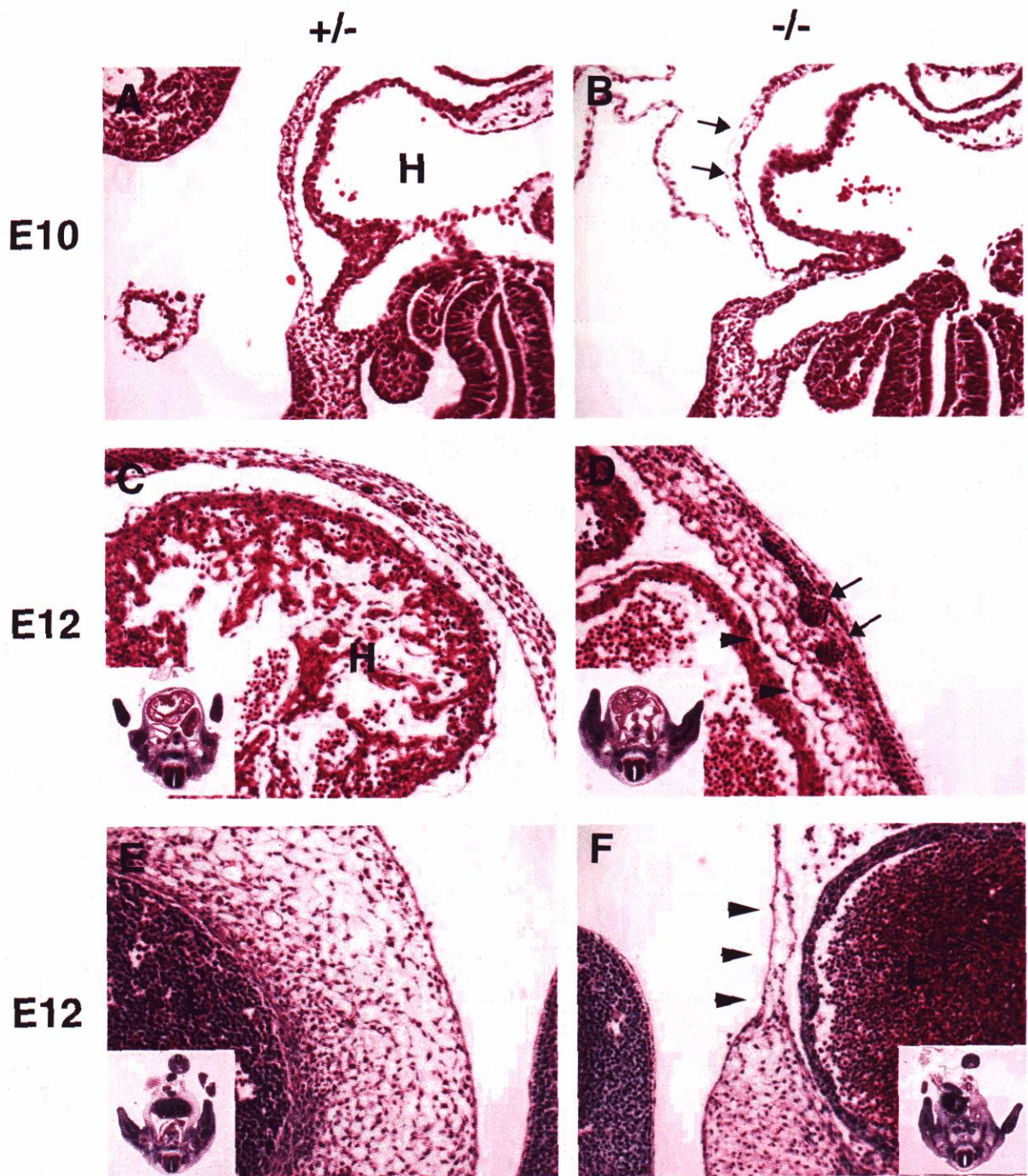


図3—10 *Mab21l2*欠損マウスにおける腹側体壁形成異常
 (A, B)E10.5 coronal切片のHE染色像。(C-F)E12 horizontal切片のHE染色像。(A, C, E)*Mab21l2*^{+/+}。(B, D, F)*Mab21l2*^{-/-}。E10.5 *Mab21l2*^{-/-}の腹側体壁は細胞が粗であった (B, 矢印)。E12 *Mab21l2*^{-/-}の胸部腹側体壁では間充織に異常な腔 (D, 矢尻) と、血管の異常形成が認められた (D, 矢印)。E12 *Mab21l2*^{-/-}の腹部腹側体壁は顕著な薄化が認められた (F, 矢尻)。H, 心臓; L, 肝臓

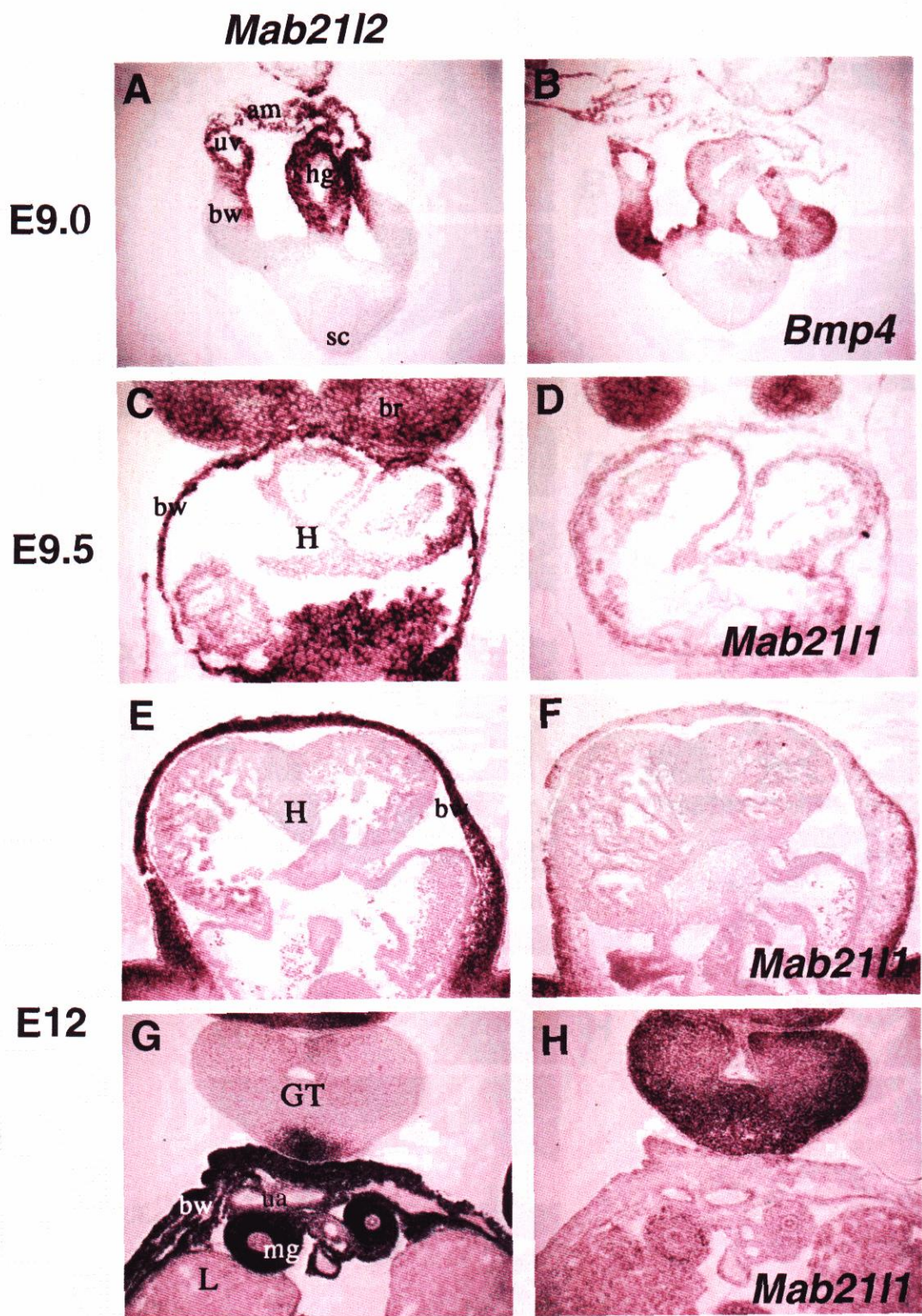


図3—11 腹側体壁における*Mab21l1*と*Mab21l2*転写産物の発現 (A, B)E9.0(22体節期)coronal切片。(C, D)E9.5 coronal切片。(E, F), 胸部horizontal切片。(G, H)腹部horizontal切片。(A, C, E, G)*Mab21l2*。(B) *Bmp4*。(D, F, H) *Mab21l1*。H, 心臓; L, 肝臓GT生殖結節; uv, 臍静脈; mg, 中腸; hg, 後腸; br, 鰓弓; bw, 体壁; sc, 脊髄; am, 羊膜; ua, 臍動脈

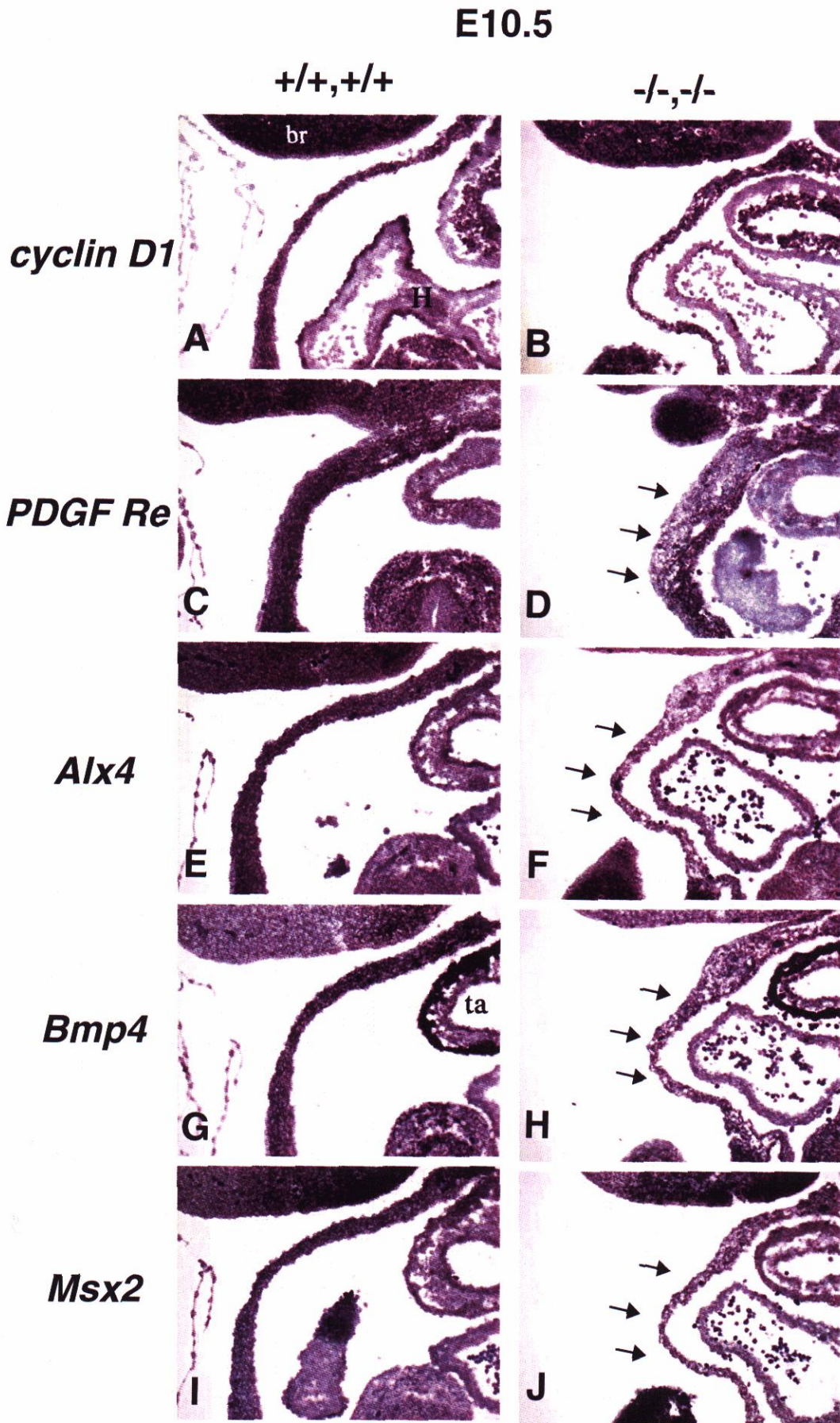


図3—1 2 E10.5 *Mab21l1/Mab21l2*二重欠損マウスにおける腹側体壁形成関連遺伝子の発現
*Mab21l1/Mab21l2*二重欠損マウス(-/-,-/-)腹側体壁において、*cyclin D1*の発現に顕著な差は観られなかった(B)。*PDGF Re*, *Alx4*, *Bmp4*, *Msx2*は減少していた(D, F, H, J 矢印)。br, 鰓弓; H, 心臓; ta, 動脈幹

days	n	+/+	+/-	-/-	normal	small	dead	lethality
E8.5	10	4	4	2	2	0	0	0%
		40%	40%	20%				
E9.5	114	31	56	27	27	0	0	0%
		27%	49%	24%				
E10.5	234	62	114	58	56	2	0	0%
		26%	49%	25%				
E11.5	240	54	128	58	49	1	8	13%
		23%	53%	24%				
E12.5	60	18	29	13	6	0	7	54%
		30%	48%	22%				
E13.5	46	14	18	14	0	5	9	64%
		30%	39%	30%				
E14.5	17	5	8	4	0	0	4	100%
		29%	47%	24%				
E15.5	37	12	23	2	0	0	2	100%
		32%	62%	5%				
adult	119	47	72	0	0	0	0	-
		39%	61%	0%				

表3-1 *Mab21l2*^{+/-} X *Mab21l2*^{+/-} の仔遺伝子型と致死率

	n	+/+,+/+	+/-,+/+	+/+,+/-	-/-,+/+	+/+,+/-	-/-,+/-	+/+,+/-	-/-,+/-	+/+,-/-	-/-,-/-	normal	samall	dead	lethality
SA x SA expected ratio		25%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	25%				
E9.5	164	35 21%	12 7%	11 7%	2 1%	60 37%	2 1%	5 3%	2 1%	4 2%	33 20%	33	0	0	0%
E10.5	94	19 20%	6 6%	5 5%	1 1%	35 37%	1 1%	5 5%	0 0%	4 4%	19 20%	18	1	0	0%
E11.5	73	10 14%	2 3%	5 7%	0 0%	34 47%	0 0%	2 3%	1 1%	1 1%	19 26%	13	0	6	32%
SA x Mab2111 expected ratio		25%	25%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	0%				
New born	116	30 26%	23 20%	9 8%	2 2%	26 22%	2 2%	26 22%	0 0%	0 0%	0 0%				
3weeks	155	50 32%	44 28%	7 5%	1 1%	48 31%	1 1%	5 3%	0 0%	0 0%	0 0%	2	0	3	

表3-2 Mab2111/Mab2112 二重欠損マウスの致死率

上記のSAは同じ染色体でMab2111/12 が欠損したヘテロ接合型(Mab2111+/-, Mab2112+/-),
上記のMab2111 は (Mab2111+/-)

第四章

mab-21 遺伝子の分子機能に関する研究

4-1 序

Mab21l1/Mab21l2 は本研究のノックアウトマウスの解析から、脊椎動物の発生過程で重要な役割を担うことが明かとなった。しかしながら、*mab-21* ファミリーは既存の遺伝子と全く相同性が見い出されず、その分子機能に関する知見はほとんど得られていない。機能未知遺伝子の分子機能を明らかにするためには、その分子と結合する分子を同定し、両分子の相互作用が示す生理的意義を検討することが有効な手段となる。筆者は Yeast two-hybrid 法により、MAB21L1 が β -tubulin と結合することを見い出したが、MAB21L1 と β -tubulin あるいは α/β -tubulin により構成される細胞内微小管に対する MAB21L1 の影響は未解明である (Yamada, 1999)。また、室山により、培養細胞を用いた強制発現系において、MAB21L1 は核と細胞質に局在することが示されたが、内在性 MAB21L1 の細胞内局在は未同定である (Muroyama, 1999)。室山は MAB21L1 の N 末端領域が MAB21L1 の核局在性に必要であることを示したが、核移行シグナル (NLS) は見い出されていない。また、核内における MAB21L1 の分子機能を示唆する知見は全く得られていない。

Sam68 (Src-associated in mitosis) は細胞分裂期において Src にリン酸化される基質として同定された (Taylor et al., 1995; Taylor and Shalloway, 1994; Wang et al., 1995)。Sam68 は Src family tyrosin kinase に加え、cdc2, p120GAP, Grb2, phospholipase C, insulin receptor, PI3 kinase 等 SH2, SH3 ドメイン (Src homology domain) をもつ多くの分子、あるいは hnRNP K, RNA helicase A とも結合することが知られ、シグナル伝達分子のアダプタータンパク質として細胞増殖、細胞分化に関与することが示唆されている (Jabado et al., 1998; Reddy et al., 2000a; Resnick et al., 1997; Richard et al., 1995; Sanchez-Margalet and Najib, 1999; Sanchez-Margalet and Najib, 2001; Trub et al., 1997; Yang et al., 2002)。Sam68 は STAR (signal transduction and activation of RNA) ファミリーに属する RNA 結合タンパク質であり、GSG (GRP33, Sam68, GLD-1) ドメインを持つことが知られている (Lin et al., 1997)。GSG ドメインをもつ分子は KH ドメイン (hnRNP K homology domain) を介し、RNA と結合することが知られている (Chen et al., 2001; Itoh et al., 2002; Lin et al., 1997; Wang et al., 1995)。GSG ドメインは線虫の癌抑制遺伝子、GLD-1, ヒト fragile X mental retardation 遺伝子産物、FMR1, マウス quaking 遺伝子産物、

Qk1 等、多種多様なタンパク質に見い出されており、GSG ドメインが翻訳制御因子として、あるいは選択的スプライシング関連因子として発生過程で重要な役割を持つことが示唆されている(Vernet and Artzt, 1997)。Sam68 は培養細胞を用いた実験から、細胞増殖を促進すること(Barlat et al., 1997)、腫瘍形成と関連すること(Liu et al., 2000)、スプライシング関連因子と核内の未知の構造(Sam68 nuclear bodies, [SNBs])で共局在すること(Chen et al., 1999)が知られるが、その生体内における役割は全く明らかにされていない。一方、Sam68 はレトロウイルス HIV-1 の遺伝子発現、およびウイルス増殖を促進することから、HIV-1 Rev タンパク質と類似した機能を持つことが示唆されている(Derry et al., 2000; Reddy et al., 1999; Reddy et al., 2000b; Soros et al., 2001)。したがって、Sam68 は RNA を核外輸送することで、遺伝子発現を促進する機能を持つと考えられている(Hope et al., 1990; Li et al., 2002a)。

本章では、MAB21L1 結合タンパク質の同定、解析を試み MAB21L1 の分子機能を明らかにすることを目的とした。特に、MAB21L1 結合タンパク質として同定した、Sam68 と MAB21L1 の相互作用による生理的意義の検討を中心に MAB21L1 の分子機能について考察する。

4-2 結果

GST-MAB21L1 融合タンパク質の精製

GST と MAB21L1 の融合タンパク質 (以下 GST- MAB21L1) の発現、精製をカイコ由来培養細胞である Sf9 を用いて試みた。昆虫細胞で発現させたタンパク質は真核生物特有の翻訳後修飾が行われるため、脊椎動物細胞で発現させたタンパク質と同等の性質を持つことが知られている (King et al, 1992)。GST と MAB21L1 全長 (1-359 アミノ酸残基)、の融合遺伝子を作製し、BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems の定法に従い、融合タンパク質を発現させた。GST、GST-MAB21L1 共に細胞全抽出液中で CBB 染色により発現が確認された。GST は SDS-PAGE 上で約 29 kDa、GST- MAB21L1 は約 60 kDa の分子量であった。定法にしたがい、Glutathione Sepharose 4B (GS4B) を用い精製を試みた。その結果、GST、GST-MAB21L1 共に 150 mm 培養皿一枚から、約 0.8 mg のタンパク質を得た (図 4-1A)。抗 GST 抗体による Western blot により、精製されたタンパク質が、GST 融合タンパク質であることを確認した (data not shown)。これに対し、N 末端 (1-172 番目のアミノ酸残基)、C 末端 (173-359 番目のアミノ酸残基) の GST- MAB21L1 融合タンパク質は、発現は認められたがほぼ全てが不溶性画分にとどまり、精製が困難であった。よって、以下の実験には GST、および GST-MAB21L1 全長 (以下 GST-MAB) を用いた。

MAB21L1 結合タンパク質の探索

GST pull-down 法により、MAB21L1 結合タンパク質の探索を試みた。マウス E12.5 胎仔 100 匹より、タンパク質量約 500 mg の細胞質抽出液 (S-100) を得た。あらかじめ 2nmol の GST (約 50 μ g)、と GST-MAB (約 100 μ g) をそれぞれ GS4B (bed vol, 150 μ l) に結合させたカラムに等量の S-100 液 を供し、界面活性剤を含む緩衝液で洗浄した後、0.3M NaCl, 0.5M NaCl, 20mM Glutathione の順で溶出画分を得た。この、溶出画分を SDS-PAGE で分離した後、銀染色によりタンパク質を検出した。0.3M NaCl 溶出画分、Glutathione 溶出画分、それぞれに GST-MAB 特異的なバンドを検出した (図 4-1B)。

MAB21L1 結合タンパク質の同定

銀染色で検出されたバンドに含まれるタンパク質を同定するために、ペプチドシーケンスを試みた。まず、0.3M NaCl 溶出画分、Glutathione 溶出画分を TCA 沈殿法により濃縮した。このサンプルを SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜にプロットし CBB 染色を行った。GST-MAB 特異的なバンドを PVDF 膜から切り出した後、ペプチドシーケンスに供した。得られたペプチドの配列を用い、データベース検索(BLAST search)を行った。検索に際し、ペプチドシーケンスの原理(エドマン分解法)を考慮して、N 末端に相同性配列が見出されるもの、および切り出したバンドと分子量が合致するものを MAB21L1 結合タンパク質の候補として選別した。その結果、Transportin, p62 ras-GAP associated protein/Sam68(Src-associated in mitosis, 68 kDa), 60S ribosomal protein L5 (L5)を同定した(図4-1C)。

上記の MAB21L1 結合タンパク質候補と、MAB21L1 との結合様式を検討するために、GST-MAB21L1 をプローブとして far western 法を行った。プローブに用いた GST-PKAsite-MAB21L1 (GP-MAB) およびコントロールに用いた GST-PKAsite (GP) は Baculovirus 発現系を用いて精製し、³²P でラベルした。GST pull-down で得られた 0.3M NaCl 溶出画分を PVDF 膜にプロットし、GP、または GP-MAB と結合させた。PVDF 膜を洗浄した後、オートラジオグラムによりシグナルを検出した。その結果、GP-MAB に結合する、約 90 kDa, 62 kDa のバンドを検出した(図4-2C)。一方 GP に結合するバンドは検出されなかった(図4-2B)。また、同様の 0.3M NaCl 溶出画分に対し、抗 Transportin 抗体、および抗 Sam68 抗体を用いて Western blot を行った。その結果、GST-MAB 溶出画分特異的に Transportin と Sam68 のバンドを検出した(図4-2D, E)。以上の結果から、MAB21L1 と Transportin、および Sam68 が試験管内の実験系において結合すること、加えて far western 法の結果から、これらは MAB21L1 と直接結合しうることが判明した。

MAB21L1 と Sam68 は細胞内で結合している

細胞内における、MAB21L1 と Sam68 の結合を検討するため、免疫沈降法を試みた。PCR で得た Sam68 の cDNA をもちい、N 末端に HA-tag を付加した Sam68

発現ベクターを構築した。一方 MAB21L1 には N 末端に FLAG-tag を付加した。Sam68 と MAB21L1 を COS7 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。細胞全抽出液に対して抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降産物から、Western blot により Sam68 を検出した (図 4-3A)。また、抗 FLAG 抗体(M2)を用いた免疫沈降でも MAB21L1 と Sam68 の結合が確認された (図 4-3B)。

細胞内における MAB21L1 と Sam68 の局在を調べるために細胞免疫染色を行った。MAB21L1-GFP 融合タンパク質をトランスフェクションした COS7 細胞を抗 Sam68 抗体で染色した。その結果、Sam68 は核に局在が認められ、MAB21L1 は核と細胞質両方に局在が認められた (図 4-4)。FLAG-MAB21L1 と HA-Sam68 でも同様の結果を得た(data not shown)。以上の結果から、MAB21L1 と Sam68 は細胞内で結合していること、加えて核内で共局在することが確認された。

Transportin と L5 は COS7, HeLa, 293 等の培養細胞で強制発現を試みたが、いずれも発現量が少なく、免疫沈降法、および免疫細胞染色で MAB21L1 との結合、あるいは細胞内局在を検討するには至らなかった。

MAB21L1 と Sam68 の結合箇所

MAB21L1 と Sam68 の分子内における結合箇所を明らかにするために、GST pull-down を行った。GST-Sam68 は Baculovirus 発現系を用いて作製し、精製した。GST-Sam68 に対し、in vitro transcription/translation (TNT) で ³⁵S ラベルした MAB21L1 を混合し、GST pull-down を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE で分離した後、オートラジオグラムで検出した。その結果、MAB21L1 の N 末端側と Sam68 が結合することが判明した (図 4-5A)。また、GST-MAB21L1 に対し、TNT で調整した Sam68 を用いて GST pull-down を行ったところ、Sam68 は KH ドメイン付近の領域で MAB21L1 と結合することが判明した (図 4-5B)。

同様に、L5 を用いて GST pull-down を行った。その結果、L5 は 98-164 番目のアミノ酸残基を介して MAB21L1 と結合することが判明した (図 4-5C)。加えて、Transportin を用いて GST pull-down を行ったところ、Transportin 全長と GST-MAB の結合が確認された。しかし、N 末端、あるいは C 末端を欠いた Transportin と GST-MAB の結合は検出されず、Transportin と MAB21L1 の結合箇所の同定には至らなかった(data not shown)。また、GST-L5 と GST-Transportin は

Baculovirus 発現系、および大腸菌を用いたタンパク質発現系、いずれにおいても精製が困難であったため、MAB21L1 の L5, Transportin に対する結合箇所の同定には至らなかった。

Sam68 は KH ドメインを介し poly(U)RNA に結合することが知られている (Wang et al., 1995)。そこで、Sam68 と poly(U)RNA の結合活性に対する MAB21L1 の影響を検討した。培養細胞に Sam68 と MAB21L1 を発現させた細胞抽出液、あるいは精製した Sam68 に MAB21L1 を添加した場合の試験管内における Sam68 の poly(U)RNA 結合量を比較した。しかし、いずれの実験系でも Sam68 の poly(U)RNA 結合活性に変化は検出されなかった (data not shown)。

Sam68 の活性に対する MAB21L1 の影響

Sam68 は最近の報告から、HIV-1 の構成タンパク質の一種である Rev と類似した活性を持つことが示された (Reddy et al., 1999; Reddy et al., 2000b)。Rev は Rev-CAT assay において、Transactivation 活性を示すこと、すなわち、Rev はレポーター遺伝子に含まれる Rev 結合領域 (Rev response element [RRE]) に結合し、スプライシングを抑制すると共に、レポーター遺伝子を選択的に核外に輸送し、レポーター遺伝子の発現量を増加させることが知られている (Hope et al., 1990; Pollard and Malim, 1998)。Sam68 は Rev-CAT assay において単独で活性を示し、かつ、Rev と協調的に働いて活性を上昇することが知られている (Reddy et al., 1999)。

そこで、MAB21L1 の Sam68 に対する影響を検討するために、Rev-CAT assay を行った。293 細胞にレポーター遺伝子 (pCMV128, 図 4-6 A) と共に、Rev, Sam68, MAB21L1 の発現ベクターを単独、あるいは混合してトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。トランスフェクション効率は β -galactisidase の活性を指標として算出し、各サンプルのトランスフェクション効率を均一化した状態で CAT enzyme assay を行った。CAT 活性は、薄層クロマトグラフィーに展開した 3-acetyl-1-deoxy Cm をオートラジオグラムにより検出し、BAS-2500 を用いて定量化した (図 4-6 B)。

その結果、MAB21L1 は量依存的に Transactivation 活性を上昇させ、コントロールに比べ約 1.7 倍 (*student-t*: $p < 0.015$) の活性を示した (図 4-7 A)。しかし、Sam68 に MAB21L1 を加えると弱冠の活性上昇が観られたが、統計的に有意な差は見出されなかった。また、Rev に対しても、MAB21L1 は影響を示さなかった

(data not shown)。一方、Rev と Sam68 の共存在下において、MAB21L1 は協調的に作用し、Transactivation 活性をさらに増強した (図 4-7B)。Rev に対しては約 2.6 倍($p < 0.05$)、Rev と Sam68 に対しては約 1.4 倍の活性を示した。以上の結果から MAB21L1 は単独で Transactivation 活性を示し、Rev 存在下において Sam68 と協調的に働くことが判明した。

生体内における Sam68, TRN, L5 と *Mab21l1* 発現領域の比較

Sam68, TRN, L5 はいずれも、Northern 法や Western blot の結果から Ubiquitous に発現することが示唆されている (Nakielny et al., 1997; Wozniak et al., 1998)。しかしながら、発生過程における発現様式は明らかにされていない。そこで、in situ hybridization, および免疫組織染色により、Sam68, TRN, L5 の発現を調べた。これまでの報告から予想された通り、Sam68, TRN, L5 はいずれも全身に発現しており組織特異性は見い出されなかった。しかしながら、いずれも網膜で強い発現が認められ、*Mab21l1/Mab21l2* の発現と重複することが判明した (図 4-8)。一方、脊髄において Sam68, TRN, L5 は ventricular zone を中心に、細胞増殖が盛んな領域に強い発現が認められた (図 4-9)。これに対し、*Mab21l1/Mab21l2* の発現は細胞分裂を終了した神経細胞で占められると考えられる mantle layer に発現が認められた。ventricular zone に特異的に発現することが知られる Sox2 の発現領域 (Kamachi et al., 1998) と、*Mab21l1/Mab21l2* の発現領域は相補的であった。

内在性 MAB21 タンパク質の細胞内局在

内在性 MAB21 タンパク質を検出するために、MAB21L1 に対するウサギポリクローナル抗体を作製した。MAB21L1/MAB21L2 は全長を通じアミノ酸配列が類似しており、94% の相同性を示すことから、MAB21L1 を認識する抗体は MAB21L2 も認識すると考えられる。MAB21L1 と MAB21L2 を識別するために、*Mab21l1*^{-/-} (-/-, +/+), *Mab21l2*^{-/-} (+/+, -/-) および *sa*^{-/-} (-/-, -/-) を用いて免疫組織染色を行った (図 4-10A-D)。その結果、野生型において、水晶体と眼杯に強い染色が認められ、*Mab21l1*^{-/-} では予定水晶体領域の染色が消失し、*sa*^{-/-} ではシグナルが完全に消失した。このことから、この抗体が確かに MAB21L1/MAB21L2 を共に認識すると判断した。*Mab21l2*^{-/-} 眼胞におけるシグナルは MAB21L1 に由来

すると推察される。水晶体、眼杯いずれにおいても核が強く染色されたことから、MAB21L1/MAB21L2 は核に局在することが判明した (図4-10A)。胎仔抽出液を用いた Western blot の結果からも、MAB21L1/MAB21L2 が細胞質に比べ核に多く存在することが示された。また、SDS-PAGE 上で MAB21L1 は約 41 kDa, MAB21L2 は約 42 kDa であることが判明した (図4-10E)。

4-3 考察

MAB21L1 結合タンパク質とその分子機能

本研究により、MAB21L1 と Sam68 の結合が示され、かつ MAB21L1 は Sam68 と協調的に作用する事が明らかとなった。Sam68 は KH ドメインを含む RNA 結合タンパク質であり、NLS, NES を持つことが知られ、核と細胞質を行き来するシャトルタンパク質として mRNA の核外輸送を促進すると考えられている (Ishidate et al., 1997; McBride et al., 1998)。Rev-CAT assay において、Sam68 は直接 RRE に結合し RNA を細胞質に輸送し、結果としてレポーター遺伝子の発現を上昇させることが示唆されている (Reddy et al., 1999)。MAB21L1 と Sam68 は培養細胞の核内で共局在することから、核内で複合体を形成し RNA の核外輸送に協調的に作用すると推察される。MAB21L1 は単独でも、Rev-CAT assay で活性上昇を示すが、本研究で用いた 293 培養細胞は内在性 Sam68 が発現しており、MAB21L1 がレポーター遺伝子と直接相互作用するかは判断できない。筆者は MAB21L1 が Sam68 の KH ドメイン付近に結合することを示したが、Sam68 の RNA 結合活性に影響は見出されず、MAB21L1 が Sam68 と RNA の複合体を安定化するとは考えにくい。一方、本研究において、MAB21L1 はシャトルタンパク質として知られる Transportin (TRN) と結合することが示唆された。TRN は hnRNP と結合し、mRNA の輸送を行うことが知られている (Siomi et al., 1997)。このことから、MAB21L1/Sam68/RNA 複合体が TRN により核から細胞質に効率的に輸送される可能性が考えられる。内在性 Sam68 をアンチセンス RNA により発現抑制すると、Rev タンパク質の核外輸送が阻害されることが示されており (Li et al., 2002a)、このことから Sam68 が RNA 輸送に作用することが支持される。一方、HIV Gag-Pol レポーターを用いた実験では、レポーター遺伝子のタンパク質量増加とレポーター遺伝子の細胞質における RNA 量に相関が観られないことから、Sam68 は RNA の輸送ではなく、翻訳効率を上昇させる役割をもつことが示唆されている (Coyle et al., 2003)。本研究により、MAB21L1 は ribosomal protein L5 (L5) とともに結合することが示されており、このことから、Sam68/MAB21L1/L5 の三量体が形成される可能性が示唆される。したがって、MAB21L1 と Sam68 は L5 と共に ribosome に直接作用し、翻訳効率を上昇させる可能性が考えられる。しかしながら、Sam68 の生体内における本来の標的 RNA

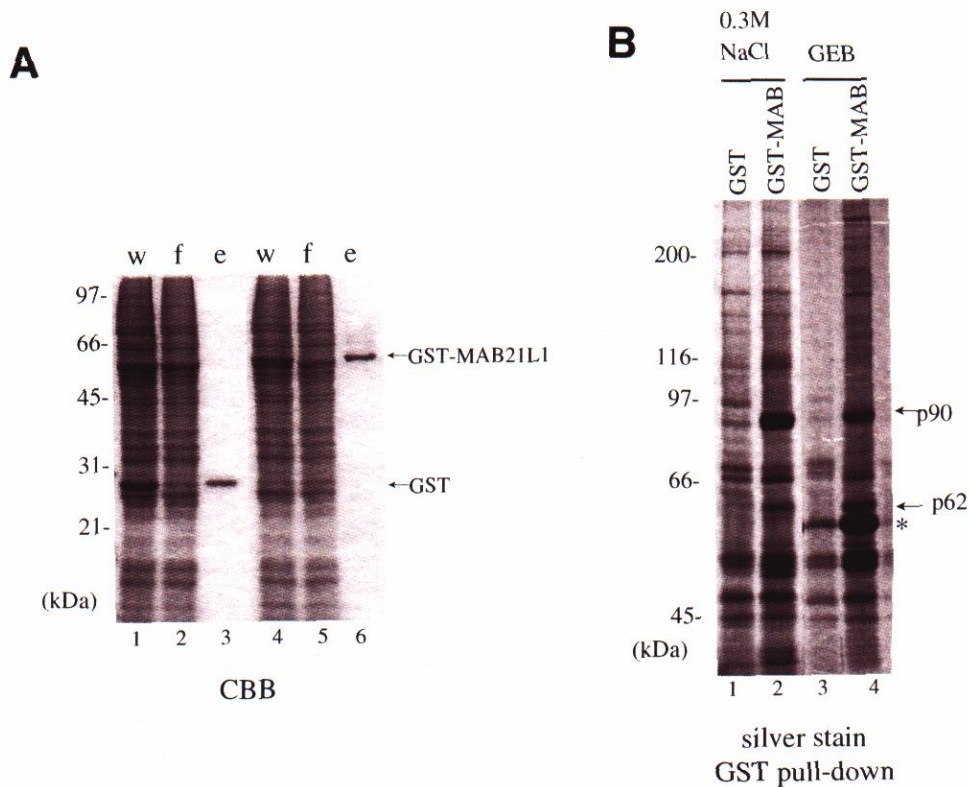
はほとんど知られておらず、生体内における役割は未解明である。最近の報告で新たに、Sam68 が白血球において CD44 の選択的スプライシングを制御することが証明された(Matter et al., 2002)。また、Sam68 は転写のコアクティベーターである CBP と結合し転写抑制活性を示すことが報告された(Hong et al., 2002)。さらに、Sam68 と同じく KH ドメインをもつ FMR1 はショウジョウバエにおいて、ribosomal protein L5/L11 と共に RNAi(RNA interference)に関連する複合体に含まれ、翻訳抑制に関連することが示された(Ishizuka et al., 2002)。KH ドメインを含む分子は RNA の輸送、安定性、翻訳制御、スプライシング制御等、多岐に渡る機能との関連が示唆されるが、その分子機能と生体内での役割はほとんど明らかにされていない。その最大の障害は標的 RNA の有効な同定法が確立されておらず、生体内における本来の役割を検討することが困難なためである。Sam68 も例外ではなく、本研究で使用した Rev-CAT assay が生体内における Sam68 の役割を反映しうるとは断定できない。したがって MAB21L1 と Sam68 の相互作用の生理的意義を検討するためには Sam68 の生体内における標的 RNA の同定、および分子機能の解明が不可欠であると考えられる。本研究で MAB21L1 との結合が見い出された TRN, L5 も Sam68 同様、その分子機能、および生体内における役割は未解明であり(Nakielny et al., 1997; Wozniak et al., 1998)MAB21L1 との相互作用の意義を検討することは困難である。MAB21L1 の分子機能は Sam68, L5, TRN の分子機能に関する知見を広げること、あるいは新たな MAB21L1 結合タンパク質を単離、同定することにより解明されると考えられる。

本研究では、免疫組織染色により内在性 MAB21L1/MAB21L2 が核に局在することを明らかにした。これに対し、MAB21L1/MAB21L2 は培養細胞を用いた強制発現系では核と細胞質両方に局在するが、細胞質への局在が強制発現によるアーティファクトであるのか、本来の局在であるのかは判断できない。しかしながら、組織内において核に局在することは明らかであり、このことから MAB21L1/MAB21L2 が核内で機能するタンパク質であることが示唆される。また、ノックアウトマウスの解析から水晶体、網膜、腹側体壁において、MAB21L1/MAB21L2 が機能することは明らかであり、これらの組織において MAB21L1/MAB21L2 が核に局在することからも MAB21L1/MAB21L2 が核内で機能することが支持される。MAB21L1/MAB21L2 は既知分子と全く相同性を示さず、既存のドメインを含まない機能未知分子であるが、細胞内局在を明ら

かにしたことで、分子機能解明の糸口を得たと考える。

生体内における MAB21L1 と Sam68 の発現領域

本研究により、生体内において Sam68 と *Mab21l1* は増殖中の細胞が多量に存在する水晶体上皮、網膜で共発現することが示された。培養細胞において、Sam68 を強制発現すると G1/S 期の進行が亢進すること (Barlat et al., 1997)、および Sam68 を欠損した血球系培養細胞は G2/M 期遅延を起こし細胞増殖が遅くなることが知られている (Li et al., 2002b)。本研究二章の結果から、*Mab21l1* の細胞増殖に対する役割が示されており、MAB21L1 と Sam68 が協調的に細胞周期を制御する可能性が考えられる。しかしながら、脊髄において *Mab21l1* は細胞増殖が盛んな ventricular zone には発現せず、Sam68 とは subventricular zone でのみ共発現する。このことから、MAB21L1 と Sam68 は細胞増殖のみならず、細胞の分化過程で何らかの役割をもつことが示唆される。脊髄において *Mab21l1* と *Mab21l2* は共に mantle layer に発現するが、この領域では細胞分裂を終えた神経細胞が盛んに分化、移動することが知られている (Altman and Bayer, 1995)。分化過程の神経細胞に対する *Mab21l1/Mab21l2* の役割の解明は今後の課題である。



C

p90 ≡ Transportin

```

>>U703221U70322.1 Human transportin (TRN) mRNA, complete (3054 aa)
                                     10
Query:                               VLDRQTKMEYEP
                                     : : : : : : : :
Sbjct: SISGPGQEA VPLRPKAEPPGSGMVWDRQTKMEYEWKPDEQGLQQILQLLKESSQSPDITI
                                     10   40   70   100  130  160

```

p62 ≡ p62 ras-GAP AP / sam68

```

>>pirISII49140 p62 ras-GAP associated phosphoprotein - mo (443 aa)
                                     10
15                               SPSKDPTKAHPXPRL
                               : : : : : : : :
pirISI MQRDDPASRLTRSSGRSCSKDPSGAHPSVRLTPSRPSPLPHRPRGGGGGPRGGARASPA
                               10   20   30   40   50   60

```

p35 ≡ 60S ribosomal protein L5

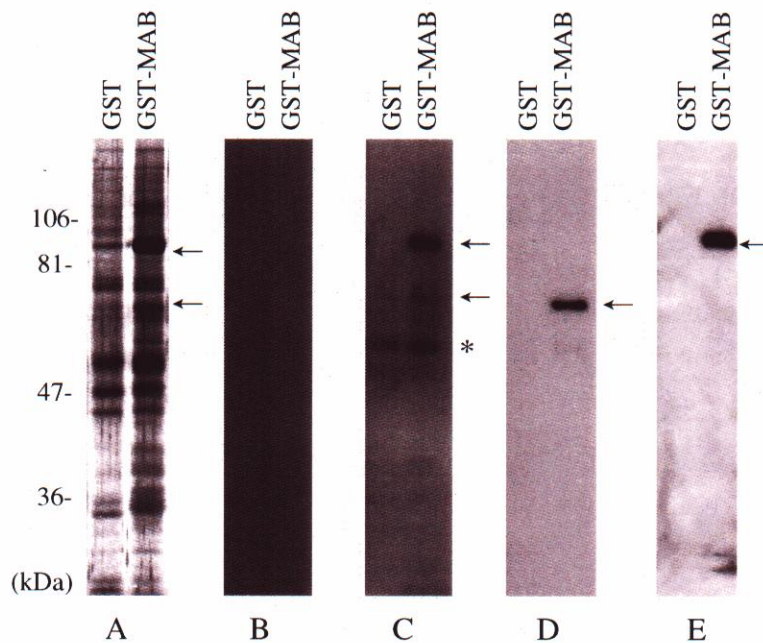
```

>>spI065353|RL5_HELAN 60S RIBOSOMAL PROTEIN L5. (297 aa)
                                     10
Query:  HFVKVVKNKHYFKLYSV
                                     : : : : : : : :
Sbjct:  MGFVKVVKNKQYFKRYQVKFKRRREGKTDYFARKRLIAQDKNKYNTPKYRLVVRFSNRDI
                                     10   20   30   40   50   60

```

図4—1 MAB21L1結合タンパク質の同定

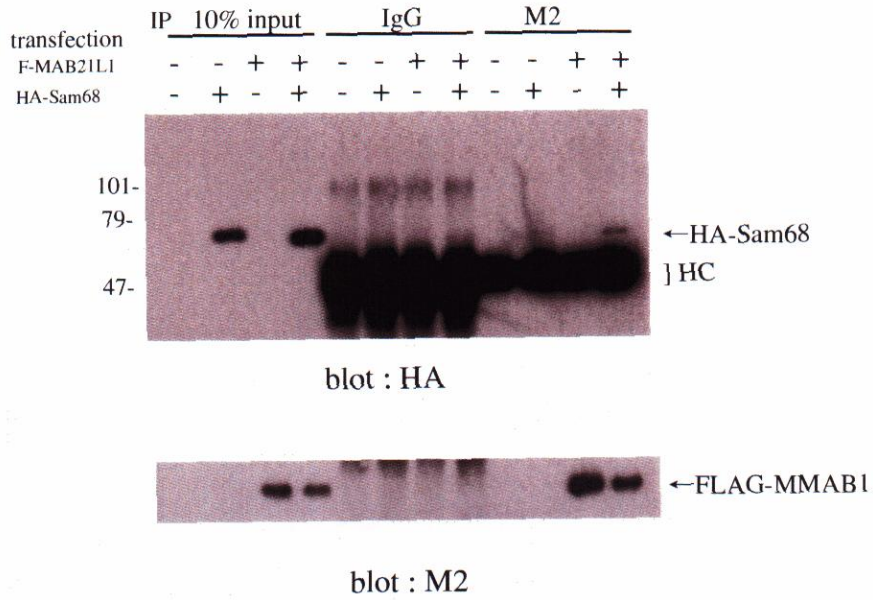
(A) GST (lane 1-3), および GST-MAB21L1 (lane 4-6) の精製。w, whole cell lysate; f, flow through; e, elution。 (B) マウス胎仔抽出液を用いた GST pull down。 (lane 1, 2) 0.3 M NaCl 溶出画分。 (lane 3, 4) Glutathione elution buffer 溶出画分。 (lane 1, 3) GST カラム溶出画分。 (lane 2, 4) GST-MAB21L1 カラム溶出画分。各溶出画分を SDS-PAGE で分離した後、銀染色によりバンドを検出した。 (C) BLAST 検索により選別した MAB21L1 結合タンパク質。Query, ペプチドシーケンスにより得られたアミノ酸配列。Subject, データベースから選別された相同性を持つ分子のアミノ酸配列。N 末端からのアミノ酸残基番号をアミノ酸配列の下に示した (Transportin のみ、cDNA クローン 5' 末端からの塩基対番号)。



A; silver stain
 B; farwestern (probe : GST , 72hr expose)
 C; farwestern (probe : GST-MAB21L1, 6hr expose)
 D; blot: anti-Sam68
 E; blot: anti-Transportin

図4—2 MAB21L1とSam68, Transportinの結合
 GST溶出画分、 GST-MAB21L1溶出画分を用いてfar western法(B, C) 抗Sam-68抗体によるWestern blot(D), 抗Transportin 抗体によるWestern blot(E)を行った。far western法により62 kDa, 90 kDaのバンドを検出した(C)。このバンドはそれぞれSam68, Transportinに相当することがWestern blotの結果から支持された(D, E)。*は非特異的結合によるバンドである (C) 。

A



B

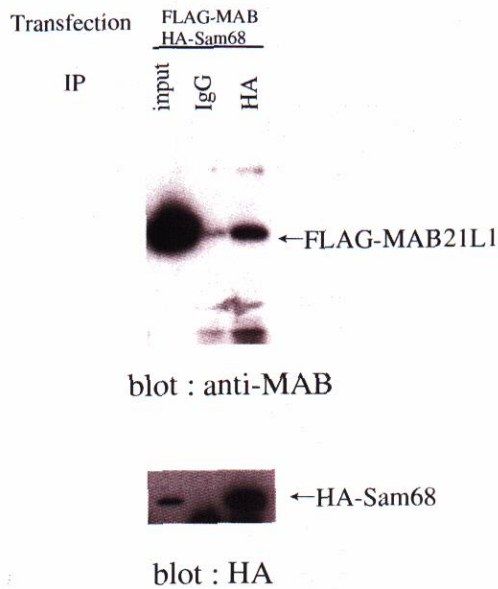


図4—3 免疫沈降法によるMAB21L1とSam68の結合の検出
 COS7細胞にMAB21L1, Sam68をトランスフェクションし、4
 8時間後に回収し、免疫沈降を行った。(A) MAB21L1を免疫
 沈降しSam68をWestern blotで検出した。(B) Sam68を免疫沈降
 しMAB21L1をWestern blotで検出した。HC, IgGH鎖

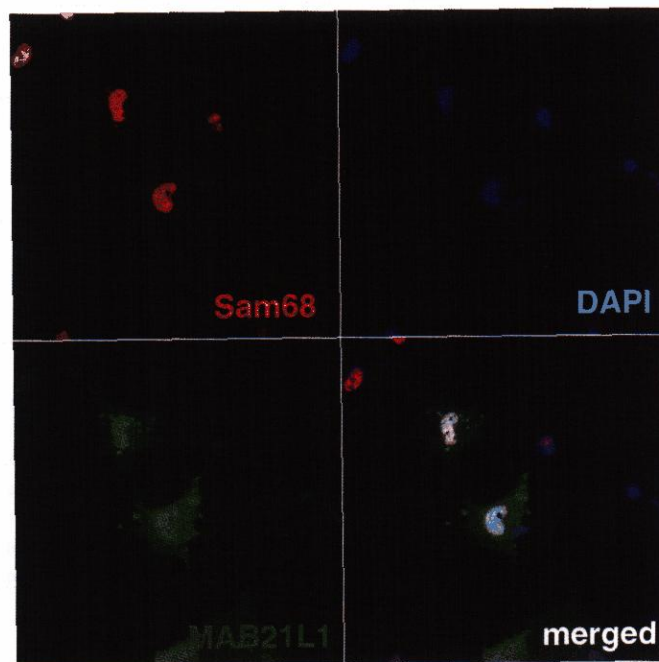


図4—4 MAB21L1とSam68の細胞内局在
COS7細胞にMAB21L1-GFPを強制発現し、48時間後に
固定し、内在性Sam68を免疫染色により検出した。

- (赤) Sam68: antiSam68 Ab
- (緑) MAB21L1-GFP
- (青) DNA
- (白) 共局在

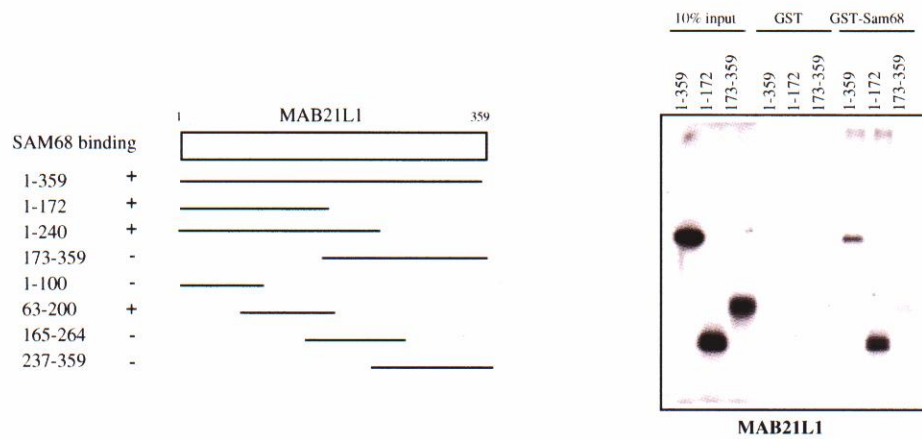
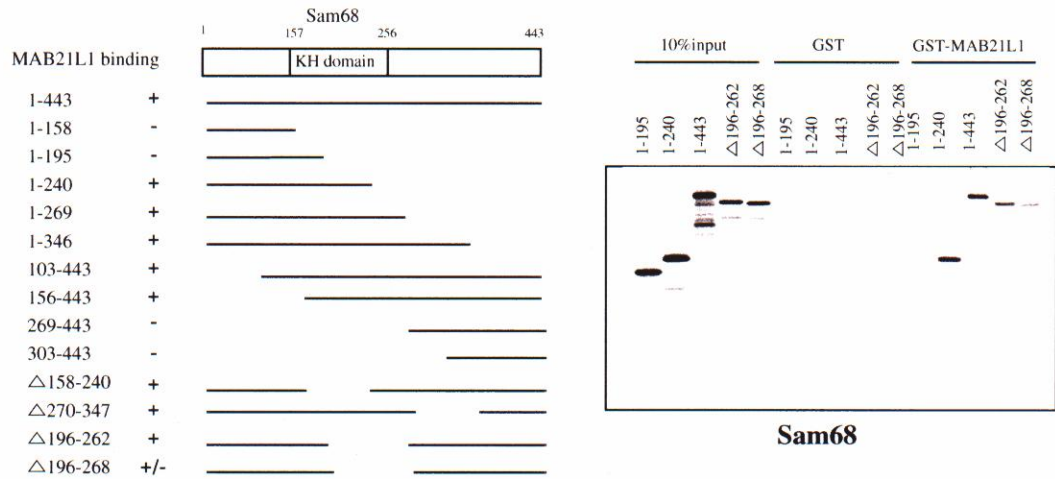
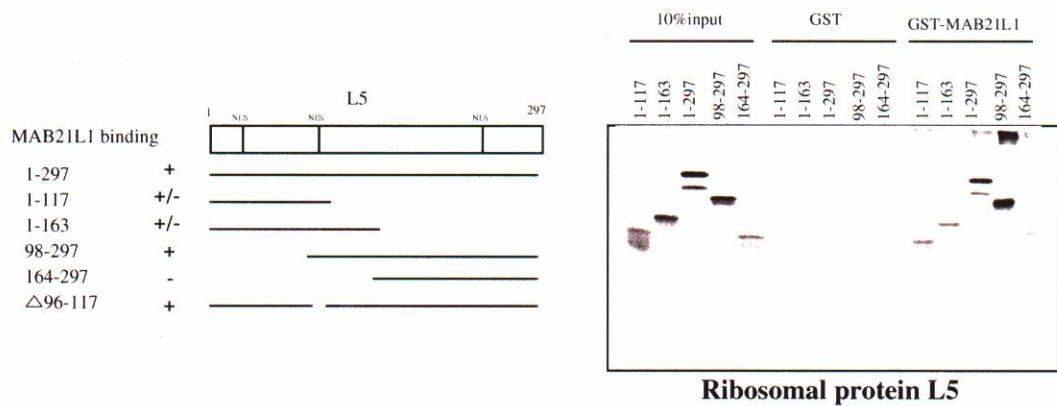
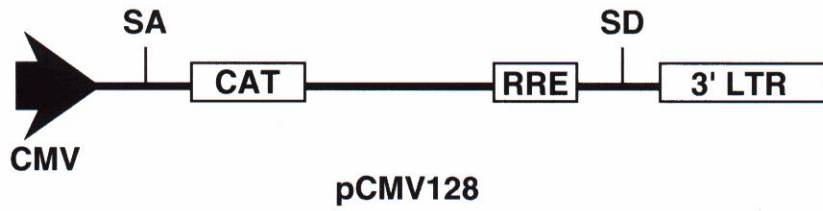
A**B****C**

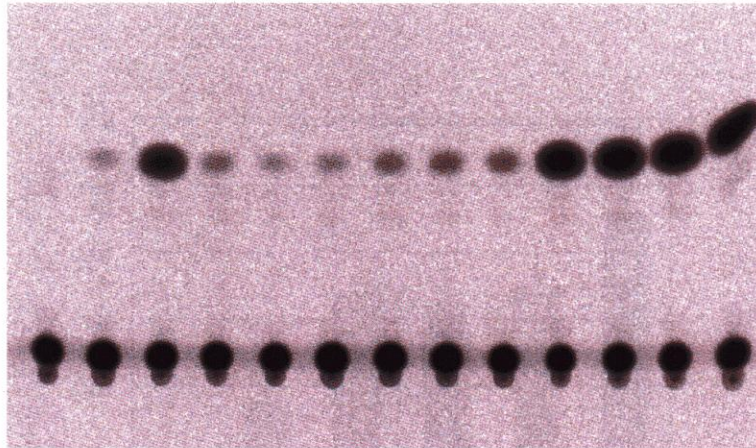
図4—5 MAB21L1とSam68, Ribosomal protein L5の結合領域の同定
 (A)TNTにより35SラベルしたMAB21L1をGST-Sam68によりGST pull-downし、オートラジオグラムにより検出したもの(右)。用いたMAB21L1変異タンパク質を直線で示し、結合の有無を+, -で示した(左)。(B) Sam68変異タンパク質とGST-MAB21L1のGST pull-down。(C) Ribosomal protein L5変異タンパク質とGST-MAB21L1のGST pull-down

A



(Hope et al., 1990, PNAS)

B



mab	-	-	-	50	250	50	125	250	-	50	125	250	(ng)
sam	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
rev	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	

Rev-CAT assay

図4-6 Rev-CAT assay

A, pCMV128 レポーター遺伝子の模式図. CMV, CMV promoter; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; RRE, Rev response element; SA, splice acceptor site; SD, splice donor site; 3' LTR, 3' long terminal repeat

B, 1-deoxy chloramphenicol (Cm)を用いたCAT enzyme assayのオートラジオグラム. 293細胞にpCMV128 (50ng), rev (10ng), Sam68 (50ng), Mab2111 (50, 125, 250 ng)をトランスフェクションし、48時間後に回収した細胞抽出液を用いてCAT enzyme assayを行った. CAT活性は薄層クロマトグラフィーに展開した3-acetyl 1-deoxy Cmにより、定量化した.

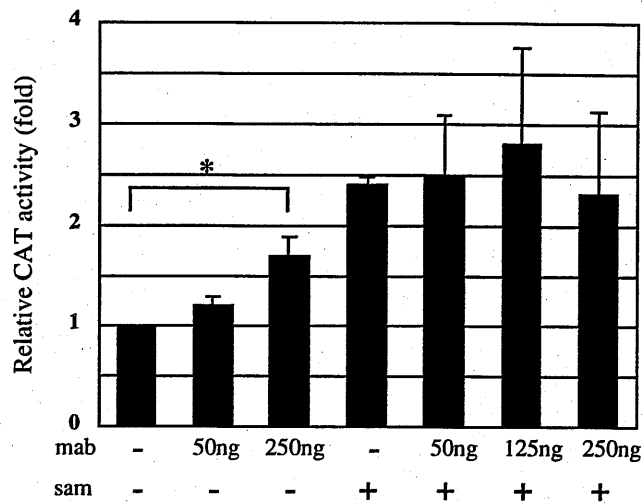
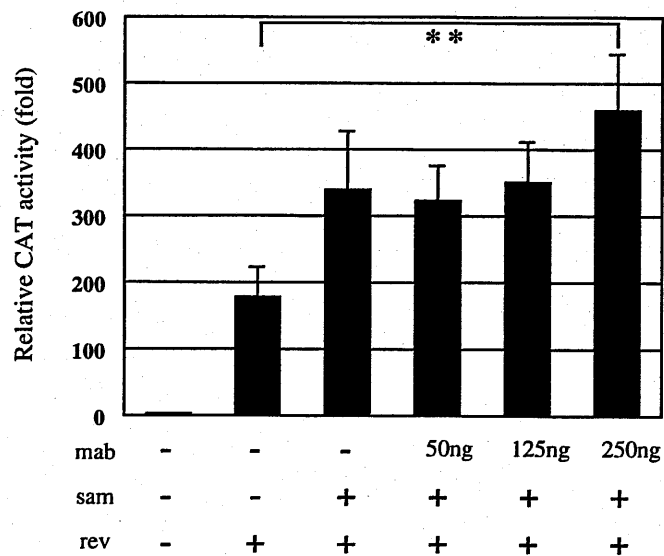
A**B**

図4—7 Rev-CAT assayにおける、Mab21L1のSam68に対する影響
 293細胞にMab21L1, Sam68, Revをトランスフェクションし、48時間後に回収し、CAT活性を測定した。トランスフェクション効率は β -galactosidaseの活性を指標に標準化した。トランスフェクションしたDNA量をグラフの下に示した。(A)Revタンパク質非存在下のCAT活性。(B)Revタンパク質存在下のCAT活性。studentのt検定により有意水準を算出した。* $P < 0.015$, ** $P < 0.05$

E13

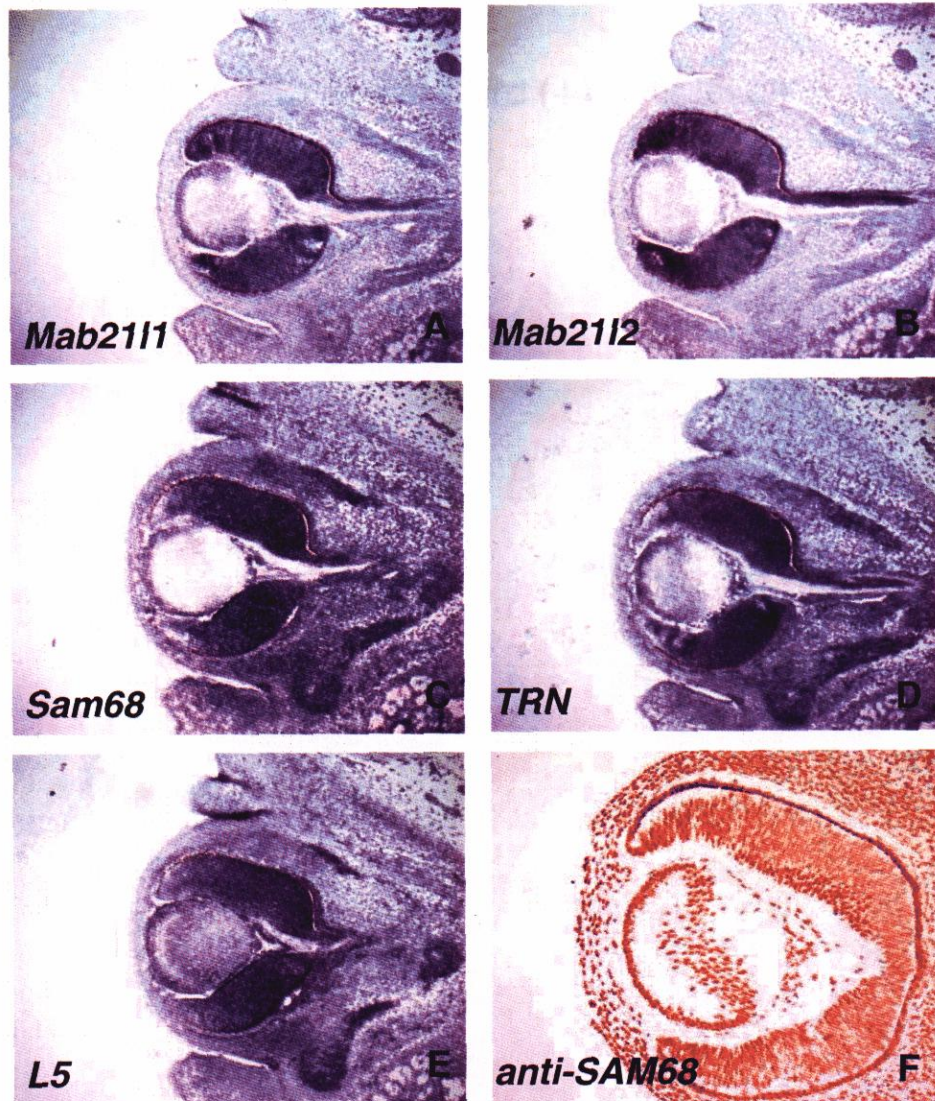


図4—8 E13眼におけるSam68, Transportin, Ribosomal protein L5の発現 (A-E) in situ hybridization。(F)Sam68の免疫染色。Sam68, Transportin (TRN), Ribosomal protein L5(L5)転写産物は網膜に強く発現していた。Sam68タンパク質は全ての細胞の核で検出された。

E13 Spinal Cord (lumber level)

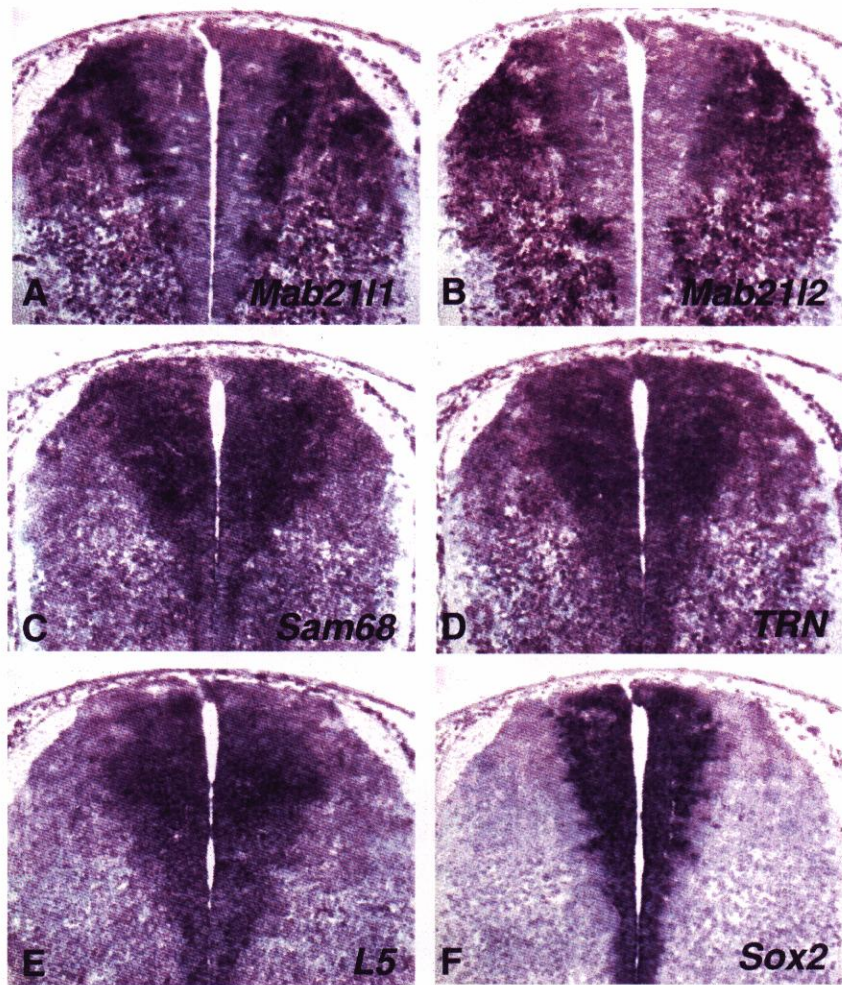


図4—9 E13脊髄におけるSam68, Transportin, Ribosomal protein L5の発現
全てin situ hybridization。

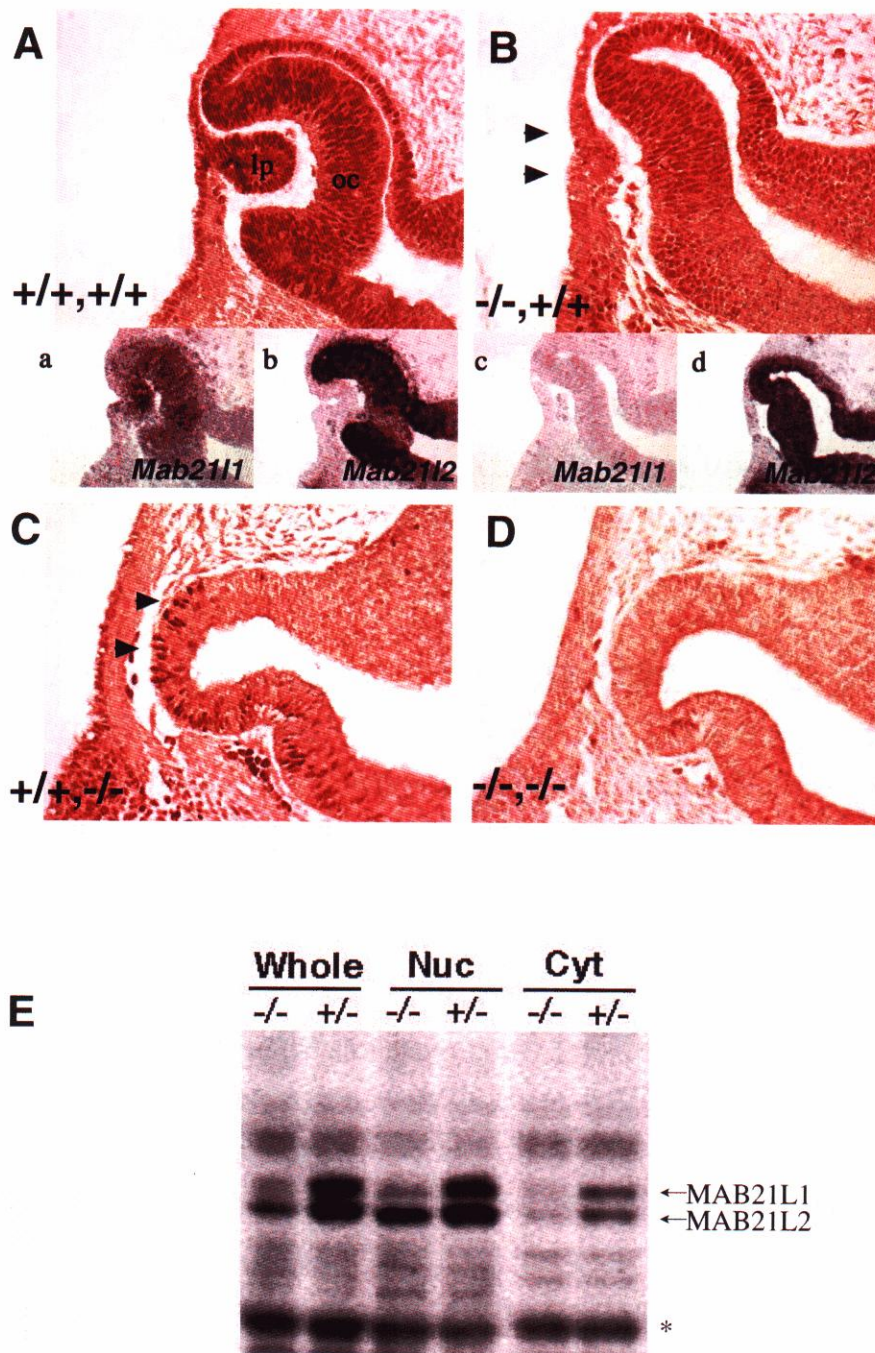


図4—10 内在性MAB21L1/MAB21L2タンパク質の検出
 (A-D) E10.5胎仔切片の抗MAB21抗体を用いた免疫組織染色。(a-d) in situ hybridization。(a, c) *Mab2111* (b, d) *Mab2112*。(A)野生型($+/+$, $+/+$)。(B) *Mab2111*単独欠損マウス($-/-$, $+/+$)。(C) *Mab2112*単独欠損マウス($+/+$, $-/-$) (D) 二重欠損マウス($-/-$, $-/-$)。($-/-$, $+/+$)では予定水晶体領域での染色が消失し (B, 矢尻) ($-/-$, $-/-$)では全てのシグナルが消失した (D)。野生型では網膜、水晶体で核に強い染色が認められた(A)。($+/+$, $-/-$) 眼胞にMAB21L1が検出された (C)。(E) E12 *Mab2111* $+/+$, $+/-$, $-/-$ 抽出液を用いたWestern blot。各レーン上部にそれぞれの遺伝子型を示した。Whole, 細胞全抽出画分。Nuc, 核抽出画分。Cyt, 細胞質画分。*非特異的バンド。

総括

本研究は、転写調節因子とその標的遺伝子に着眼して行われた。第一章では、*Mab2111* と *Hoxc4* の遺伝学的相互作用を明らかにし、このことから *Mab2111* は肋骨形成過程において *Hoxc4* により発現制御されることが推察される。また、包皮腺形成過程における *Mab2111* と *Hoxd13* の遺伝学的関連性を示唆した。第二章では水晶体形成過程において *Mab2111* は *Pax6* により発現制御されることを明らかにした。第三章では腹側体壁形成過程において *Mab2112* が *Hoxb* クラスタにより発現制御される可能性を示唆した。

mab-21 ファミリーは線虫からヒトまで高度に保存されており、今までの研究から、発生過程において線虫、ゼブラフィッシュ、カエル、マウスで重要な役割を持つことが示唆されていた(Chow et al., 1995; Kawahara et al., 2002; Kudoh and Dawid, 2001; Wong and Chow, 2002)。線虫の生殖感覚器である ray 形成過程において、*mab-21* は線虫の *Hox* 遺伝子である *egl-5* と *Pax6* の ortholog である *mab-18* の機能的修飾因子として働くと考えられている(Chow and Emmons, 1994; Chow et al., 1995)。さらに *mab-21* は ray 形成過程で *TGF- β* シグナルの遺伝学的下流で働くことが示唆されている(Morita et al., 1999)。本研究により、*Mab2111* が水晶体形成過程で *Pax6* の遺伝学的下流で働くことが明らかにされた。このことは、線虫における *TGF- β /mab-18/mab-21* 遺伝学的経路とマウスにおける *Bmp7/Pax6/Mab2111* 遺伝学的経路(第二章参照)の類似性を示唆するものであり、両生物種において形態形成機構が保存されている可能性が考えられる。しかしながら、線虫の ray とマウスの水晶体の組織形成に関する共通要素は知られておらず、従ってこの類似した遺伝学的経路の機能的役割は解釈が困難である。一方、*Mab2111*-/- は包皮腺形成異常を示し、*Hoxd13* の突然変異体 *spd* の表現型との類似性が見い出された(Johnson et al., 1998)。このことから、包皮腺形成過程における *Mab2111* と *Hoxd13* の遺伝学的関連性が示唆される。*egl-5* と *Hoxd13* は共にショウジョウバエ *Hox* 遺伝子である *abdominal-B* の ortholog であると考えられ(de Rosa et al., 1999)、このことは *egl-5/mab-21* 遺伝学的経路と、*Hoxd13/Mab2111* 遺伝学的経路が ray と包皮腺で保存されている可能性を示唆する。さらに、*Hoxc4* 遺伝子産物が *Mab2111* の発現制御領域に結合すること、および肋骨形成過程に

において *Mab21l1* と *Hoxc4* が遺伝学的に相互作用することが示された。これらの事実は *mab-21/Mab21l1* が線虫とマウスで共通の *Hox* 標的遺伝子である可能性を支持するものである。また、*Mab21l1* は *Hoxc4* と *Hoxd13* との関連が示されたことから、複数の *Hox* 遺伝子により発現制御される可能性が考えられる。ショウジョウバエにおいて数種類の *Hox* 遺伝子が共通の標的遺伝子を発現制御することが知られている。例えば *TGF-β* の ortholog である *decapentaplegic* は *Ultrabithorax(Ubx)* と *abd-A* に発現制御されることが知られ、ホメオドメインをコードする *Distal-less* は *Ubx*, *abd-A* と *Deformed* に発現制御されることが知られている (Capovilla et al., 1994; O'Hara et al., 1993; Vachon et al., 1992)。さらに、数々のノックアウトマウスの解析から、*Hox* 遺伝子は補償性を示し、互いに類似した機能を持つことが知られている (Branford et al., 2000; Warot et al., 1997; Wellik et al., 2002)。このことから、複数の *Hox* が共通の標的遺伝子を発現制御することが推測される。したがって、哺乳類の水晶体、肋骨、包皮腺の形成過程における *Mab21l1/Hox/Pax6* 遺伝学的経路と、線虫の ray 形成過程における *mab-21/egl-5/mab-18* 遺伝学的経路との共通性が伺える。

脊椎動物の眼と昆虫の複眼は全く異なる形態形成過程を経て発生することから、独立した進化的起源から生じ、類似した機能を獲得した相似器官であると認識されていた。しかしながら両器官で *Pax6* が重要な役割を持つこと、および *Pax6* と相互作用する分子群の類似性がショウジョウバエ (*twin of eyless/ eyless/ sine oculis/ eys absent/ dachshund*) とマウス (*Pax6/ Six3,6/ Eya1-3/ Dach1*) で発見されたことにより、今日では眼と複眼は相似器官ではなく、相同器官であると考えられている (Gehring and Ikeo, 1999; Pichaud and Desplan, 2002)。本研究から示唆された、遺伝学的経路の存在は、一見異なる器官であるマウスの眼、骨格、生殖器、と線虫 ray の相同性を示唆するものであり、これらの器官がなんらかの組織的、あるいは機能的類似性をもつとも考えられる。マウスの包皮腺と線虫 ray は共に生殖に関連する器官であり、*mab-21* ファミリーを中心とする形態形成機構を解明することにより、相同器官であることが証明されるかもしれない。逆に、遺伝学的経路が変化することにより、同一の起源から形態的には異なる器官が生じるとも考えられ、*mab-21* に関連する遺伝学的経路を異種生物間、あるいは異なる器官同士で比較することにより、形態的多様性の獲得機構が明らかにされると期待される。

現在までの様々な解析から、分子機能が種を超えて保存され、ortholog として

発生過程で類似した役割を担うことは多くの遺伝子で見い出されている。しかしながら、転写調節因子と、その標的遺伝子の関係が、種を超えてどのように保存されるのか、またどのように変化するかという問題は、形態形成を理解する上で最も興味深い問題であるにも関わらず、ほとんど解析がなされていない。形態の変化は分子機能の変化よりも、むしろ遺伝子発現制御の変化による影響が大きいと考えられており (Palopoli and Patel, 1998)、転写調節制御機構の変化が形態の多様性、さらには生物種の多様性を生じると考えられる。

転写調節因子の標的遺伝子は単離、同定が困難であり、それに従い、転写調節因子による遺伝子発現制御機構に関する知見は限られている。このような現状の中で、本研究により支持された、線虫、マウス異種生物間で保存された共通の *Hox* 標的遺伝子である *mab-21* ファミリーの存在は、転写調節因子と標的遺伝子の関係が異種動物間でどのように変化するか理解する上で、良い指標となると考えられる。*mab-21* 遺伝子の異種生物間における発現制御機構、生体内における役割、および分子機能の解明を通じ、動物のみならず、生物全般の形態形成を分子的に理解する上で、非常に重要な知見が得られると考えられる。

様々な生物においてゲノムプロジェクトが終了し、個々の分子機能が蓄積されつつある現在において、分子間相互作用に関する情報をいかにして体系的に理解するかが今後の分子生物学の最重要課題である。タンパク質-タンパク質間相互作用が live imaging 技術の発展に伴い、生体内で生理的意義を検出可能に成りつつある事に比べ、タンパク質-核酸間の相互作用の検出法は今だ試験管内に留まっている。*Mab21ll* は従来の方法による煩雑な過程を経て単離、同定された *Hox* 標的遺伝子であるが、本研究により *Hox* との遺伝学的相互作用が示されたことから、生体内における真の *Hox* 標的遺伝子であることが支持された。この事実は、友常の実験法の有効性を示唆するものであり、この方法を改良し DNA microarray 等の技術と組み合わせることで、一つの転写調節因子の標的遺伝子を網羅的に単離、同定することが可能になると考えられる。そこで得られる結果を基に、一つの転写調節因子が幾つの標的遺伝子を、何時、何処で、どのように発現調節するのか、あるいは一つの遺伝子の発現を幾つの転写調節因子が、どのような作用機序で発現調節するのか、という問題が解消されると予想され、今後の進展が渴望される。転写調節因子による遺伝子発現制御機構の全貌を明らかにすることで、形態形成のみならず、生命現象の理解が質的に発展すると期待される。

材料と方法

基本的な実験手法は Sambrook (Sambrook et al., 1989) らの方法に従って行った。

組織切片の作製

摘出したマウス胎仔を 4%パラホルムアルデヒド[4% Paraformaldehyde (Chyoda Junyaku Inc.), 0.1M phosphate buffer pH7.4]中に 4 度で一晩静置し、固定した。50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% エタノールに各 30 分ずつ浸して脱水した。さらに Methyl Benzoate に組織片が沈むまで浸し、キシレンに 1 時間ずつ 3 回、キシレン：パラフィン=1：1 に 37°C で 1 時間、パラフィン (Wako mp50-52°C) に 54°C で 30 分ずつ 2 回浸した後、包埋した。ミクロトームで 8µm に薄切し、MAS コートしたスライドガラス(MATSUNAMI)に伸展した。40°C で一晩乾燥した後室温で保存した。

in situ hybridization

操作手順は基本的に Nieto らの方法にしたがった(Nieto et al., 1996))。特筆すべき事項を以下に示す。

<Whole mount ISH>

Proteinase K 処理: E8~E9, 5min, E10~E11, 15min, E12~E13, 30min, 37°C hybridization: 73.5°C, Wash, 73.5°C

<Section, ISH>

Proteinase K 処理: 5min 室温

hybridization: 65°C, 5xSSC

Wash, 65°C, 2xSSC または 0.2xSSC

プローブの鋳型は基本的に、PCR で増幅した断片を pBSK に挿入して作製した。プローブは DIG RNA labeling Mix(Roche)を用いてラベルした。

Foxe3, Rx, Bmp4, Bmp7, Sox2, c-maf, Chx10, Otx2, Six3, Hes1, Brn3b, αA-

crystallin, γ A-*crystallin*, *Pax6* (Blixt et al., 2000; Furukawa et al., 1997; Furuta et al., 1997; Kamachi et al., 1998; Kawauchi et al., 1999; Liu et al., 1994; Matsuo et al., 1995; Oliver et al., 1995; Sasai et al., 1992; Turner et al., 1994; van Leen et al., 1987; Walther and Gruss, 1991; Wistow and Piatigorsky, 1988; Xu et al., 1993).

免疫組織化学染色

組織切片をキシレンに10分間、3回、100%、90%、70%エタノールに各5分間浸し、脱パラフィンした。10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で5分間、microwave 処理した後、0.02M PBS で洗い、3%過酸化水素に10分間浸し脱色した。0.02M PBS で3分間2回洗った後、0.5% スキムミルク (Difco) 0.02M PBS で希釈した1次抗体をのせ、4°Cで一晩静置した。0.02M PBS で3分間、3回洗い、100倍希釈した2次抗体 (HRP 標識-抗ウサギ IgG, MBL, 458) をのせ、37°Cで1時間静置した。0.02M PBS で3分間3回洗った後、発色溶液[0.01% 過酸化水素、0.01% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Wako), 0.05M Tris-Cl, pH7.5] 中、37°C度で5~15分間発色した。0.02M PBS で反応を停止した後、キシレンに透徹し ENTELLAN (MERK)で封入した。1次抗体の希釈倍率を以下に示す。MAB-21 抗体(1:100)、抗 PAX6 抗体(1:1000)(Inoue et al., 2000)、抗 Sam68 抗体(1:100)(Santacruz, sc-1238, sc-333)、抗 cyclin D2 抗体(1:1000)(Santacruz, sc-593)。

細胞増殖、細胞死の検出

妊娠雌マウスに3mgのBromo-deoxy-uridine (BrdU)を腹腔注射し、1時間後に胎仔を摘出し、4%PFAで固定した。パラフィン切片を作製し、免疫組織染色と同様に切片の前処理をし、BrdU Labeling and Detection Kit II (Alkaline phosphatase, Roche)を用い、抗BrdU抗体により染色した。細胞死の検出はIn Situ Cell Death Detection Kit (HRP, Roche)に従って、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

法により検出した。

キメラマウスの作出

Mab2111^{-/-} は不妊性を示したため、Toyoda らの方法 (Toyoda et al, 1972a; Toyoda et al, 1972b)に従って試験管内受精により *Mab2111^{-/-}* 胎仔を得た。成体 *Mab2111^{-/-}* 雌に 5 i.u. の pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)を注射し、48 時間後に 5 i.u. の human chorionic gonadotropin (hCG) を注射した。hCG 注射の 16 時間後に未受精卵を摘出し、TYH 培地で培養した。成体 *Mab2111^{-/-}* 雄から精子を摘出し、TYH 培地で希釈した(Toyoda et al, 1972a)。未受精卵と精子を混合し、試験管内受精した後、24 時間 m-WM 培地で培養した (Witten, 1971)。8 細胞期の *Mab2111^{-/-}*胎仔と野生型胎仔(*ROSA26^{+/+}*)を混合しキメラマウス胎仔を作製した (Koizumi et al., 2001)。キメラマウスは E12.5 に相当する時期に摘出し、[1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, and 0.02% NP-40 in PBS]で固定した。固定した胎仔を [1 mg/ml X-Gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, and 0.02% NP-40] 37°C で 2 日間発色させ、 β -galactosidase 活性を染色した。

Western blotting

マウス胎仔を適当な大きさに分断し、dounce homogenizer で破碎した後、タンパク質量を Bradford 法により定量した。2X SDS sample buffer [100mM Tris-Cl pH6.8, 200mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol] を加え、95 °C で 5 分間加熱し、サンプルとした。マウス組織サンプルは 1 レーンに全タンパク質量約 50 μ g をアプライした。サンプルは SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写した。Transfer buffer の組成は [25mM Tris, 200mM Glycine, 0.1% SDS, 20% Methanol] である。メンブレンを 2% スキムミルクを含む TBS-T [25mM Tris-Cl pH7.5, 137mM NaCl, 5mM K Cl, 0.1% Tween] で、室温にて 1 時間振蕩した。2% スキムミルク TBS-T で希釈した 1 次抗体溶液中で、メンブレンを室温で 1 時間

振蕩し、TBS-T で洗淨した後に、2次抗体溶液中で室温、1時間振蕩した。メンブランをTBS-T で15分、3回洗淨した後、ECL(Amersham) でシグナルを検出した。抗 MAB-21 抗体(1:3000)、HRP 標識-抗ウサギ IgG(ZYMED 62-1820) (1:5000) 、HRP 標識-抗マウス IgG(MBL 330) (1:3000)。

抗体作製、精製

大腸菌で発現させた His-MAB21L1 全長を SDS-PAGE で分離し、ゲル溶出し、抗原としてウサギに免疫した。血清は GST-MAB21L1 全長を CNBr に結合したカラムを用い、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。1.5g の CNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia Biotech) に対して 10mg の精製タンパク質を Coupling buffer[0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3] 中で、室温、2時間振蕩し、カップリングした。ビーズを 0.2M Glycin pH8.0 でブロッキングした後、Wash buffer I [0.1M Sodium Acetate pH4, 0.5M NaCl] , Wash buffer II [0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3] で交互に各4回洗淨した。ビーズを Wash buffer III [20mM Tris-Cl, pH7.5, 0.5M NaCl] で平衡化した後、5mL のポリクローナル抗体を加え 4°C で一晩振蕩した。ビーズを Wash buffer III で洗淨した後、0.15M NaCl で平衡化した。ビーズの2倍量の 0.2M Glycin pH2.8 で溶出し、溶出液は 1/20 体積の 1M Tris-Cl, pH8.0 と穏やかに混合した。溶出液は PBS に透析した後 BSA 1% を加え凍結保存した。

Baculovirus 発現タンパク質の作製

発現ベクターは pFASTBAC1 (Gibco) に、GST-MAB21L1/L2 を含む断片を挿入して作製した。Bacmid の作製は Bac-to-Bac Baculovirus expression systems (Gibco) にしたがって行った。ウイルスの作製は BacPAK Baculovirus expression system (Clontech #K1601-1) にしたがって行った。旋回培養で維持した Sf-9 細胞を Grace's (++) 培地[Grace's insect cell culture medium (Gibco#11300-043), 2% Yeastolate Solution (Gibco#18190-041), 2% Lactoalbumin Hydrolysate Solution (Gibco#18080-

036), 4.2mM NaHCO₃, 10% FBS, 50 units/mL Penicillin, 50 μg/mL Streptomycin, adjust pH to 6.0 with NaOH] を、トランスフェクションに先立って 5X10⁵ cells/35mm dish、でプレATINGし、27°C、1時間培養した。Grace's (-) 培地[Grace's insect cell culture medium (Gibco#11300-043), 2% Yeastolate Solution (Gibco#18190-041), 2% Lactoalbumin Hydrolysate Solution (Gibco#18080-036), 4.2mM NaHCO₃, 10% FBS] で1回洗浄した後、1mLのDNA溶液を加え27°C、5時間培養した。DNA溶液はSolution A [5 μg Bacmid DNA, 100 μL Grace's (-)] とSolution B [6 μL CELLECTIN Reagent (Gibco), 100 μL Grace's (-)]を混合し、室温で30分静置した後、0.8mLのGrace's (-)を加えて作製した。プレートからDNA溶液を除き、2mLのGrace's (++)を加え、27度で48時間から72時間培養した。この培養上清を用いて新たに培養したSf-9細胞を感染させ、ウイルスを含む培養上清を回収し4°Cまたは-80°Cで保存した。感染した細胞をサンプルとしてSDS-PAGEを行った後、CBB染色、Western blottingにより過剰発現させたGSTMAB-211L1/L2タンパク質を検出した。回収した細胞を可溶化緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40]中で4°C、30分清置した後、100,000xgで20分遠心し細胞抽出液を得た。GST融合タンパク質の精製はGST Gene Fusion System(Pharmacia)に従った。

GST pull-down assay

1μgの精製したGST及びGST融合タンパク質と、TNT Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega)で³⁵Sラベルしたタンパク質をそれぞれ混合し、100μLのBinding buffer [20mM Tris-Cl pH7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% Triton-X100]中で室温、2時間振蕩した。この混合溶液に、bed volume 10μLのGlutathione Sepharose 4Bを加え室温で10分間振蕩した。800 rpm, 1分の遠心分離で回収したペレットをBinding bufferで5回洗浄した。ペレットを20μLの2X sample bufferに可溶化し、12%ゲルでSDS-PAGEを行った。ゲルをCBB染色した後乾燥し、BAS2500を用いてタンパク質を検出した。

Rev CAT assay

12穴プレートで培養した293細胞に全DNA量0.75 μ gをトランスフェクションし、48時間培養した後に回収した。0.25M Tris-HCl(pH7.5)に細胞を懸濁し、液体窒素を用い凍結融解により細胞を破碎した。共導入したLacZにより β -galactosidase活性を測定し、トランスフェクション効率を定量化した。 β -galactosidase活性をサンプル間で均一化し、CAT酵素反応を行った。CAT酵素活性の検出、定量はCAT Enzyme Assay System (Promega)に従って行った。

Genotyping

成体の尻尾、または胎仔のYork SacをLysis buffer [50mM Tris-Cl pH8.0, 100mM NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS, 150 μ g/mL Proteinase K (SIGMA)] 中で溶解し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿により、ゲノムDNAを回収した。*Mab21l1*, *Mab21l2* ノックアウトマウスはES細胞の選別、F1はsouthern blotにより遺伝子型を確認し、系統の維持、その後の解析はPCRにより遺伝子型を確認した。以下にPCRに用いたprimerを示す。

m1F:5'-CAGTGCCAAGCAAGCTCATC-3',

m1R:5'-GCAGATAGGGCTGTATGCTG-3'

neoR:5'-GCATCTGCGTGTTCTGAATTC-3'.

m2F:5'-GACCACCAAAGACTAAGAAC-3',

m2R:5'-CGTAGGAGAGCTTGACTTGC-3'

PCRの条件は: 35 cycles at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute.

Hoxc4 ノックアウトマウス(Hirano et al.,1996)はsouthern blotにより、遺伝子型を確認した。*Sey* 変異体の遺伝子型はGrindleyらの方法に従った(Grindley et al., 1995)。

謝辞

本研究を行うにあたり、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物代謝調節学講座、高橋直樹教授には、研究環境だけでなく、終始適切にご指導を賜りました。心から感謝いたします。本研究を進めるにあたり、同助手、岡南政宏博士（現、近畿大学）、同助手、小島拓哉博士には実験指導とご助言を賜りました。深く感謝いたします。

千葉大学大学院、医学研究院、古関明彦教授、同、古関庸子氏にはノックアウトマウス、キメラマウスの作製のみならず、数々の貴重なご助言を賜りました。深く感謝致します。東北大学大学院医学研究科、大隅典子教授、同助手、野村真博士、同学生、高橋将文氏には *Small eye* 変異体、抗 PAX6 抗体の分与と、丁寧なご指導、ご助言を賜りました。深く感謝いたします。

奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター動物分子工学部門、山中伸弥助教授、同、一阪朋子技官には、実験動物施設の利用にあたり多大なる尽力を賜りました。心から感謝いたします。

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、高橋淑子助教授（現理化学研究所、CDB）にはプローブ(*Msx1/2*)の分与と貴重なご助言を賜りました。深く感謝いたします。プローブを提供して下さった、小椋利彦博士(*Bmp2/4, Tbx5, Lhx2*)、影山龍一郎博士(*Hes1/5*)、加藤順也博士(*cyclinD1, p27^{kip1}*)、古田泰秀博士(*Bmp7*)、松尾勲博士(*Otx2*)に、感謝いたします。

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物分子遺伝学講座、釣本敏樹助教授、同、四方孔博士には Baculovirus 発現系、及び生化学全般の実験指導を賜りました。また、宮崎医科大学第二生化学講座、中山健男教授にはペプチドシークエンスをして頂きました。心より感謝いたします。

高橋研究室で *mab-21* の研究に携わった白木岐奈氏、萩原正人氏、松井理恵氏、室山優子博士、ならびに高橋研究室の皆様には、励ましと助言を頂きました。心から感謝の意を表します。

最後に、心の支えとなり見守ってくれた家族と美穂に感謝します。

山田 竜一

引用文献

- Albrecht, A. N., Schwabe, G. C., Stricker, S., Boddreich, A., Wanker, E. E. and Mundlos, S. (2002). The synpolydactyly homolog (spdh) mutation in the mouse -- a defect in patterning and growth of limb cartilage elements. *Mech Dev* **112**, 53-67.
- Altman, J. and Bayer, SA. (1995). ATLAS of PRENATAL RAT BRAIN DEVELOPMENT, CRC Press.
- Andrew, D. J. and Scott, M. P. (1992). Downstream of the homeotic genes. *New Biol* **4**, 5-15.
- Ashery-Padan, R. and Gruss, P. (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 706-14.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. and Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* **14**, 2701-11.
- Aubin, J., Lemieux, M., Moreau, J., Lapointe, J. and Jeannotte, L. (2002). Cooperation of Hoxa5 and Pax1 genes during formation of the pectoral girdle. *Dev Biol* **244**, 96-113.
- Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Behringer, R. R. and Jeannotte, L. (1998). Transcriptional interferences at the Hoxa4/Hoxa5 locus: importance of correct Hoxa5 expression for the proper specification of the axial skeleton. *Dev Dyn* **212**, 141-56.
- Ausubel, F. M. (1993). Preparation of Nuclear and Cytoplasmic Extracts from Mammalian Cells: Jhon Wiley & Sons., Inc.
- Baird, S. E., Fitch, D. H., Kassem, I. A. and Emmons, S. W. (1991). Pattern formation in the nematode epidermis: determination of the arrangement of peripheral sense organs in the *C. elegans* male tail. *Development* **113**, 515-26.
- Barlat, I., Maurier, F., Duchesne, M., Guitard, E., Tocque, B. and Schweighoffer, F. (1997). A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J Biol Chem* **272**, 3129-32.
- Barrow, J. R. and Capecchi, M. R. (1996). Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* **122**, 3817-28.
- Beckers, J. and Duboule, D. (1998). Genetic analysis of a conserved sequence in the HoxD complex: regulatory redundancy or limitations of the transgenic approach? *Dev Dyn* **213**, 1-11.

- Bel, S., Core, N., Djabali, M., Kieboom, K., Van der Lugt, N., Alkema, M. J. and Van Lohuizen, M.** (1998). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes in mice. *Development* **125**, 3543-51.
- Bel-Vialar, S., Core, N., Terranova, R., Goudot, V., Boned, A. and Djabali, M.** (2000). Altered retinoic acid sensitivity and temporal expression of Hox genes in polycomb-M33-deficient mice. *Dev Biol* **224**, 238-49.
- Bernier, G., Panitz, F., Zhou, X., Hollemann, T., Gruss, P. and Pieler, T.** (2000). Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* **93**, 59-69.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F. and Blasi, F.** (1998). The novel homeoprotein Prepl modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *Embo J* **17**, 1434-45.
- Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S. H., O'Leary, D. D. and Lemke, G.** (1999). The homeodomain protein vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes Dev* **13**, 3092-105.
- Blixt, A., Mahlapuu, M., Aitola, M., Pelto-Huikko, M., Enerback, S. and Carlsson, P.** (2000). A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev* **14**, 245-54.
- Boulet, A. M. and Capecchi, M. R.** (1996). Targeted disruption of hoxc-4 causes esophageal defects and vertebral transformations. *Dev Biol* **177**, 232-49.
- Brady, J. P., Garland, D., Duglas-Tabor, Y., Robison, W. G., Jr., Groome, A. and Wawrousek, E. F.** (1997). Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 884-9.
- Branford, W. W., Benson, G. V., Ma, L., Maas, R. L. and Potter, S. S.** (2000). Characterization of Hoxa-10/Hoxa-11 transheterozygotes reveals functional redundancy and regulatory interactions. *Dev Biol* **224**, 373-87.
- Brent, A. E. and Tabin, C. J.** (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 548-57.
- Bromleigh, V. C. and Freedman, L. P.** (2000). p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev* **14**, 2581-6.
- Bronson, F. H. and Caroom, D.** (1971). Preputial gland of the male mouse; attractant function. *J Reprod Fertil* **25**, 279-82.

- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L. and Glaser, T. (1998).** Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* **125**, 4821-33.
- Brownell, I., Dirksen, M. and Jamrich, M. (2000).** Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis* **27**, 81-93.
- Bruneau, S., Johnson, K. R., Yamamoto, M., Kuroiwa, A. and Duboule, D. (2001).** The mouse Hoxd13(spdh) mutation, a polyalanine expansion similar to human type II synpolydactyly (SPD), disrupts the function but not the expression of other Hoxd genes. *Dev Biol* **237**, 345-53.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M. Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N. L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V. I. et al. (1996).** Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet* **12**, 376-84.
- Capovilla, M., Brandt, M. and Botas, J. (1994).** Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in Drosophila midgut morphogenesis. *Cell* **76**, 461-75.
- Care, A., Silvani, A., Meccia, E., Mattia, G., Stoppacciaro, A., Parmiani, G., Peschle, C. and Colombo, M. P. (1996).** HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* **16**, 4842-51.
- Casares, F. and Mann, R. S. (1998).** Control of antennal versus leg development in Drosophila. *Nature* **392**, 723-6.
- Chan, S. K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J. and Mann, R. S. (1994).** The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell* **78**, 603-15.
- Chan, S. K. and Mann, R. S. (1996).** A structural model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5223-8.
- Chen, T., Boisvert, F. M., Bazett-Jones, D. P. and Richard, S. (1999).** A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Mol Biol Cell* **10**, 3015-33.
- Chen, T., Cote, J., Carvajal, H. V. and Richard, S. (2001).** Identification of Sam68 arginine glycine-rich sequences capable of conferring nonspecific RNA binding to the GSG domain. *J Biol Chem* **276**, 30803-11.

- Chipman, R. K. and Albrecht, E. D. (1974). The relationship of the male preputial gland to the acceleration of oestrus in the laboratory mouse. *J Reprod Fertil* **38**, 91-6.
- Chow, K. L. and Chan, K. W. (1999). Stress-induced phenocopy of *C. elegans* defines functional steps of sensory organ differentiation. *Dev Growth Differ* **41**, 629-37.
- Chow, K. L. and Emmons, S. W. (1994). HOM-C/Hox genes and four interacting loci determine the morphogenetic properties of single cells in the nematode male tail. *Development* **120**, 2579-92.
- Chow, K. L., Hall, D. H. and Emmons, S. W. (1995). The mab-21 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates. *Development* **121**, 3615-26.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126**, 4213-22.
- Chow, R. L. and Lang, R. A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 255-96.
- Ciemerych, M. A., Kenney, A. M., Sicinska, E., Kalaszczyńska, I., Bronson, R. T., Rowitch, D. H., Gardner, H. and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* **16**, 3277-89.
- Collinson, J. M., Hill, R. E. and West, J. D. (2000). Different roles for Pax6 in the optic vesicle and facial epithelium mediate early morphogenesis of the murine eye. *Development* **127**, 945-56.
- Condie, B. G. and Capecchi, M. R. (1994). Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* **370**, 304-7.
- Coyle, J. H., Guzik, B. W., Bor, Y. C., Jin, L., Eisner-Smerage, L., Taylor, S. J., Rekosh, D. and Hammarskjöld, M. L. (2003). Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol Cell Biol* **23**, 92-103.
- Davis, A. P. and Capecchi, M. R. (1994). Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development* **120**, 2187-98.
- de Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B. and Balavoine, G. (1999). Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **399**, 772-6.
- Derry, J. J., Richard, S., Valderrama Carvajal, H., Ye, X., Vasioukhin, V.,

- Cochrane, A. W., Chen, T. and Tyner, A. L. (2000). Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol Cell Biol* 20, 6114-26.
- Di Rocco, G., Mavilio, F. and Zappavigna, V. (1997). Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific Hox-Pbx complex. *Embo J* 16, 3644-54.
- Dimanlig, P. V., Faber, S. C., Auerbach, W., Makarenkova, H. P. and Lang, R. A. (2001). The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development* 128, 4415-24.
- Duboule, D. (1995). Vertebrate Hox genes and proliferation: an alternative pathway to homeosis? *Curr Opin Genet Dev* 5, 525-8.
- Duncan, I. (1987). The bithorax complex. *Annu Rev Genet* 21, 285-319.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. *Embo J* 13, 3551-60.
- Estivill-Torres, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D. J. and Rashbass, P. (2002). Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129, 455-66.
- Faber, S. C., Dimanlig, P., Makarenkova, H. P., Shirke, S., Ko, K. and Lang, R. A. (2001). Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128, 4425-38.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I. and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9, 2364-72.
- Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Chatterjee, B., Senft, E., Wurst, W., Blanquet, V., Grimes, P., Sporle, R. et al. (1996). The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13870-5.
- Ferda Percin, E., Ploder, L. A., Yu, J. J., Arici, K., Horsford, D. J., Rutherford, A., Bapat, B., Cox, D. W., Duncan, A. M., Kalnins, V. I. et al. (2000). Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Genet* 25, 397-401.

- Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N. and Eto, K. (1994). Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* **57**, 31-8.
- Furukawa, T., Kozak, C. A. and Cepko, C. L. (1997). rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3088-93.
- Furuta, Y. and Hogan, B. L. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* **12**, 3764-75.
- Furuta, Y., Piston, D. W. and Hogan, B. L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* **124**, 2203-12.
- Fusaki, N., Iwamatsu, A., Iwashima, M. and Fujisawa, J. (1997). Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* **272**, 6214-9.
- Gan, L., Xiang, M., Zhou, L., Wagner, D. S., Klein, W. H. and Nathans, J. (1996). POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3920-5.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F. M., Krumlauf, R. and Chambon, P. (1998). Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* **125**, 1123-36.
- Geada, A. M., Gaunt, S. J., Azzawi, M., Shimeld, S. M., Pearce, J. and Sharpe, P. T. (1992). Sequence and embryonic expression of the murine Hox-3.5 gene. *Development* **116**, 497-506.
- Gehring, W. J. and Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* **15**, 371-7.
- Godwin, A. R. and Capecchi, M. R. (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* **12**, 11-20.
- Goring, D. R., Breitman, M. L. and Tsui, L. C. (1992). Temporal regulation of six crystallin transcripts during mouse lens development. *Exp Eye Res* **54**, 785-95.
- Goto, J., Miyabayashi, T., Wakamatsu, Y., Takahashi, N. and Muramatsu, M. (1993). Organization and expression of mouse Hox3 cluster genes. *Mol Gen Genet* **239**, 41-8.
- Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I. and White, R. A. (1990). Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature* **348**, 308-12.

- Gould, A. P. and White, R. A. (1992). Connectin, a target of homeotic gene control in *Drosophila*. *Development* **116**, 1163-74.
- Graba, Y., Aragnol, D., Laurenti, P., Garzino, V., Charmot, D., Berenger, H. and Pradel, J. (1992). Homeotic control in *Drosophila*; the scabrous gene is an in vivo target of Ultrabithorax proteins. *Embo J* **11**, 3375-84.
- Grainger, R. M. (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet* **8**, 349-55.
- Green, E. S., Stubbs, J. L. and Levine, E. M. (2003). Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators. *Development* **130**, 539-52.
- Greer, J. M. and Capecchi, M. R. (2002). Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron* **33**, 23-34.
- Grindley, J. C., Davidson, D. R. and Hill, R. E. (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433-42.
- Guazzi, S., Lonigro, R., Pintonello, L., Boncinelli, E., Di Lauro, R. and Mavilio, F. (1994). The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *Embo J* **13**, 3339-47.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Pieler, T. and Gruss, P. (1999). Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev* **13**, 3106-14.
- Halpern, M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* **10**, 325-62.
- Hanson, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Seto, M. et al. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14372-7.
- Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 56-64.
- Heldin, C. H., Ostman, A. and Ronnstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F79-113.
- Henderson, D. J., Conway, S. J. and Copp, A. J. (1999). Rib truncations and fusions in the Sp2H mouse reveal a role for Pax3 in specification of the ventro-lateral and posterior parts of the somite. *Dev Biol* **209**, 143-58.

- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. and van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox- containing gene. *Nature* **354**, 522-5.
- Hirsch, N. and Grainger, R. M. (2000). Induction of the lens. *Results Probl Cell Differ* **31**, 51-68.
- Ho, S. H., So, G. M. and Chow, K. L. (2001). Postembryonic expression of *Caenorhabditis elegans* mab-21 and its requirement in sensory ray differentiation. *Dev Dyn* **221**, 422-30.
- Hong, W., Resnick, R. J., Rakowski, C., Shalloway, D., Taylor, S. J. and Blobel, G. A. (2002). Physical and functional interaction between the transcriptional cofactor CBP and the KH domain protein Sam68. *Mol Cancer Res* **1**, 48-55.
- Hope, T. J., Huang, X. J., McDonald, D. and Parslow, T. G. (1990). Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7787-91.
- Horan, G. S., Kovacs, E. N., Behringer, R. R. and Featherstone, M. S. (1995a). Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev Biol* **169**, 359-72.
- Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A. and Behringer, R. R. (1995b). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* **9**, 1667-77.
- Huang, R., Zhi, Q., Schmidt, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B. and Christ, B. (2000). Sclerotomal origin of the ribs. *Development* **127**, 527-32.
- Hudson, R., Taniguchi-Sidle, A., Boras, K., Wiggan, O. and Hamel, P. A. (1998). *Alx-4*, a transcriptional activator whose expression is restricted to sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Dyn* **213**, 159-69.
- Hughes, C. L. and Kaufman, T. C. (2002). Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol Dev* **4**, 459-99.
- Ingersoll, D. W., Morley, K. T., Benvenga, M. and Hands, C. (1986). An accessory sex gland aggression-promoting chemosignal in male mice. *Behav Neurosci* **100**, 777-82.
- Inoue, T., Nakamura, S. and Osumi, N. (2000). Fate mapping of the mouse

- prosencephalic neural plate. *Dev Biol* **219**, 373-83.
- Ishidate, T., Yoshihara, S., Kawasaki, Y., Roy, B. C., Toyoshima, K. and Akiyama, T.** (1997). Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett* **409**, 237-41.
- Ishizuka, A., Siomi, M. C. and Siomi, H.** (2002). A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**, 2497-508.
- Itoh, M., Haga, I., Li, Q. H. and Fujisawa, J.** (2002). Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res* **30**, 5452-64.
- Jabado, N., Jauliac, S., Pallier, A., Bernard, F., Fischer, A. and Hivroz, C.** (1998). Sam68 association with p120GAP in CD4+ T cells is dependent on CD4 molecule expression. *J Immunol* **161**, 2798-803.
- Johnson, K. R., Sweet, H. O., Donahue, L. R., Ward-Bailey, P., Bronson, R. T. and Davisson, M. T.** (1998). A new spontaneous mouse mutation of Hoxd13 with a polyalanine expansion and phenotype similar to human synpolydactyly. *Hum Mol Genet* **7**, 1033-8.
- Jones, A. R. and Schedl, T.** (1995). Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam68. *Genes Dev* **9**, 1491-504.
- Jones, F. S., Holst, B. D., Minowa, O., De Robertis, E. M. and Edelman, G. M.** (1993). Binding and transcriptional activation of the promoter for the neural cell adhesion molecule by HoxC6 (Hox-3.3). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6557-61.
- Jones, F. S., Prediger, E. A., Bittner, D. A., De Robertis, E. M. and Edelman, G. M.** (1992). Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2086-90.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R. and Kondoh, H.** (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* **125**, 2521-32.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. and Kondoh, H.** (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* **15**, 1272-86.
- 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.

- Kawahara, A., Chien, C. B. and Dawid, I. B. (2002).** The homeobox gene *mbx* is involved in eye and tectum development. *Dev Biol* **248**, 107-17.
- Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K. and Yamamoto, M. (1999).** Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor *c-Maf*. *J Biol Chem* **274**, 19254-60.
- Kenyon, C. (1994).** If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution. *Cell* **78**, 175-80.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1990).** Murine developmental control genes. *Science* **249**, 374-9.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1991).** Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.
- King, L.A. and Prose, R.D. (1992).** The baculovirus expression system, a laboratory guide. Chapman and Hall, London.
- Kmita, M., Fraudeau, N., Herault, Y. and Duboule, D. (2002).** Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature* **420**, 145-50.
- Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. (2001).** The role of presenilin 1 during somite segmentation. *Development* **128**, 1391-402.
- Kondoh, H. (1999).** Transcription factors for lens development assessed in vivo. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 301-8.
- Kondoh, H. (2002).** Develo~~op~~ment of the Eye. *Mouse Development, edited by Rossant J. and Tam PPL. (Academic Press)*, 519-538.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J. K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K. et al. (2000).** *Tbx5* and the retinotectum projection. *Science* **287**, 134-7.
- Krumlauf, R. (1992).** Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* **14**, 245-52.
- Krumlauf, R. (1994).** Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Kudoh, T. and Dawid, I. B. (2001).** Zebrafish *mab2112* is specifically expressed in the presumptive eye and tectum from early somitogenesis onwards. *Mech Dev* **109**, 95-8.
- Lagutin, O., Zhu, C. C., Furuta, Y., Rowitch, D. H., McMahon, A. P. and Oliver, G.**

- (2001). Six3 promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos. *Dev Dyn* **221**, 342-9.
- Lau, G. T., Wong, O. G., Chan, P. M., Kok, K. H., Wong, R. L., Chin, K. T., Lin, M. C., Kung, H. F. and Chow, K. L.** (2001). Embryonic XMab2112 expression is required for gastrulation and subsequent neural development. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1378-84.
- Lengler, J., Krausz, E., Tomarev, S., Prescott, A., Quinlan, R. A. and Graw, J.** (2001). Antagonistic action of Six3 and Prox1 at the gamma-crystallin promoter. *Nucleic Acids Res* **29**, 515-26.
- Lewis WH** (1904). Experimental studies on the development of the eye in Amphibia. I. On the origin of the lens, *Rana palustris*. *Am J Anat* **3**, 505-536.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B. O. and He, J. J.** (2002a). Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol* **76**, 8374-82.
- Li, Q. H., Haga, I., Shimizu, T., Itoh, M., Kurosaki, T. and Fujisawa, J.** (2002b). Retardation of the G2-M phase progression on gene disruption of RNA binding protein Sam68 in the DT40 cell line. *FEBS Lett* **525**, 145-50.
- Lin, Q., Taylor, S. J. and Shalloway, D.** (1997). Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J Biol Chem* **272**, 27274-80.
- Liu, I. S., Chen, J. D., Ploder, L., Vidgen, D., van der Kooy, D., Kalnins, V. I. and McInnes, R. R.** (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* **13**, 377-93.
- Liu, K., Li, L., Nisson, P. E., Gruber, C., Jessee, J. and Cohen, S. N.** (2000a). Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblasts. *J Biol Chem* **275**, 40195-201.
- Liu, W., Khare, S. L., Liang, X., Peters, M. A., Liu, X., Cepko, C. L. and Xiang, M.** (2000b). All Brn3 genes can promote retinal ganglion cell differentiation in the chick. *Development* **127**, 3237-47.
- Loosli, F., Winkler, S. and Wittbrodt, J.** (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev* **13**, 649-54.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L., Sohocki, M., Bradley, A. and Karsenty, G.**

- (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* **9**, 2808-20.
- Luo, J. and Miller, M. W.** (1999). Platelet-derived growth factor-mediated signal transduction underlying astrocyte proliferation: site of ethanol action. *J Neurosci* **19**, 10014-25.
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. and Wilson, S. W.** (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* **121**, 3267-78.
- Manley, N. R., Barrow, J. R., Zhang, T. and Capecchi, M. R.** (2001). Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Dev Biol* **237**, 130-44.
- Margolis, R. L., Stine, O. C., McInnis, M. G., Ranen, N. G., Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Brando, L. V., Kidwai, A. S., Loev, S. J., Breschel, T. S. et al.** (1996). cDNA cloning of a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell fate-determining gene mab-21: expression, chromosomal localization and analysis of a highly polymorphic (CAG)_n trinucleotide repeat. *Hum Mol Genet* **5**, 607-16.
- Mariani, M., Baldessari, D., Francisconi, S., Viggiano, L., Rocchi, M., Zappavigna, V., Margaretti, N. and Consalez, G. G.** (1999). Two murine and human homologs of mab-21, a cell fate determination gene involved in *Caenorhabditis elegans* neural development. *Hum Mol Genet* **8**, 2397-406.
- Mariani, M., Corradi, A., Baldessari, D., Margaretti, N., Pozzoli, O., Fesce, R., Martinez, S., Boncinelli, E. and Consalez, G. G.** (1998). Mab21, the mouse homolog of a *C. elegans* cell-fate specification gene, participates in cerebellar, midbrain and eye development. *Mech Dev* **79**, 131-5.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P.** (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55.
- Marquardt, T. and Gruss, P.** (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32-8.
- Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M. H., Muchamore, I., Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* **360**, 737-41.
- Martinez-Morales, J. R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A. and Bovolenta, P.** (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye.

- Development* 128, 2019-30.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. and Jamrich, M. (1997).** The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-7.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S. (1995).** Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9, 2646-58.
- Matter, N., Herrlich, P. and Konig, H. (2002).** Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691-5.
- McBride, A. E., Taylor, S. J., Shalloway, D. and Kirkegaard, K. (1998).** KH domain integrity is required for wild-type localization of Sam68. *Exp Cell Res* 241, 84-95.
- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J. (1984).** A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-8.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992).** Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- Medina-Martinez, O., Bradley, A. and Ramirez-Solis, R. (2000).** A large targeted deletion of Hoxb1-Hoxb9 produces a series of single-segment anterior homeotic transformations. *Dev Biol* 222, 71-83.
- Meira-Lima, I. V., Zhao, J., Sham, P., Pereira, A. C., Krieger, J. E. and Vallada, H. (2001).** Association and linkage studies between bipolar affective disorder and the polymorphic CAG/CTG repeat loci ERDA1, SEF2-1B, MAB21L and KCNN3. *Mol Psychiatry* 6, 565-9.
- Meyer, A. (1998).** Hox gene variation and evolution. *Nature* 391, 225, 227-8.
- Morita, K., Chow, K. L. and Ueno, N. (1999).** Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. *Development* 126, 1337-47.
- Morrison, A., Moroni, M. C., Ariza-McNaughton, L., Krumlauf, R. and Mavilio, F. (1996).** In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development* 122, 1895-907.
- Morrison-Graham, K., Schatteman, G. C., Bork, T., Bowen-Pope, D. F. and Weston, J. A. (1992).** A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development* 115, 133-42.
- Morsi El-Kadi, A. S., in der Reiden, P., Durston, A. and Morgan, R. (2002).** The

- small GTPase Rap1 is an immediate downstream target for Hoxb4 transcriptional regulation. *Mech Dev* **113**, 131-9.
- Muroyama, Y. (1999). 修士論文「Hox-C4 下流標的遺伝子 MMAB の分子機能の解析」(奈良先端科学技術大学院大学)
- Muta, M., Kamachi, Y., Yoshimoto, A., Higashi, Y. and Kondoh, H. (2002). Distinct roles of SOX2, Pax6 and Maf transcription factors in the regulation of lens-specific delta1-crystallin enhancer. *Genes Cells* **7**, 791-805.
- Nakielny, S., Fischer, U., Michael, W. M. and Dreyfuss, G. (1997). RNA transport. *Annu Rev Neurosci* **20**, 269-301.
- Nelson, C. E., Morgan, B. A., Burke, A. C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L. C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L. F. and Tabin, C. (1996). Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* **122**, 1449-66.
- Nieto, M. A., Patel, K. and Wilkinson, D. G. (1996). In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol* **51**, 219-35.
- O'Hara, E., Cohen, B., Cohen, S. M. and McGinnis, W. (1993). Distal-less is a downstream gene of Deformed required for ventral maxillary identity. *Development* **117**, 847-56.
- Ohsaki, K., Morimitsu, T., Ishida, Y., Kominami, R. and Takahashi, N. (1999). Expression of the Vax family homeobox genes suggests multiple roles in eye development. *Genes Cells* **4**, 267-76.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045-55.
- Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E. P., Doe, C. Q. and Gruss, P. (1993). Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev* **44**, 3-16.
- Ormestad, M., Blixt, A., Churchill, A., Martinsson, T., Enerback, S. and Carlsson, P. (2002). Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1350-7.
- Paine-Saunders, S., Viviano, B. L., Zupicich, J., Skarnes, W. C. and Saunders, S. (2000). glypican-3 controls cellular responses to Bmp4 in limb patterning and skeletal development. *Dev Biol* **225**, 179-87.

- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. and Brinster, R. L. (1987).** Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* **50**, 435-43.
- Palopoli, M. F. and Patel, N. H. (1998).** Evolution of the interaction between Hox genes and a downstream target. *Curr Biol* **8**, 587-90.
- Pan, L., Xie, Y., Black, T. A., Jones, C. A., Pruitt, S. C. and Gross, K. W. (2001).** An Abd-B class HOXPBX recognition sequence is required for expression from the mouse Ren-1c gene. *J Biol Chem* **276**, 32489-94.
- Penkov, D., Tanaka, S., Di Rocco, G., Berthelsen, J., Blasi, F. and Ramirez, F. (2000).** Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* **275**, 16681-9.
- Pichaud, F. and Desplan, C. (2002).** Pax genes and eye organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 430-4.
- Pollard, V. W. and Malim, M. H. (1998).** The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D. et al. (1997).** Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935-44.
- Qian, Y. Q., Billeter, M., Otting, G., Muller, M., Gehring, W. J. and Wuthrich, K. (1989).** The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* **59**, 573-80.
- Qu, S., Tucker, S. C., Zhao, Q., deCrombrughe, B. and Wisdom, R. (1999).** Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development* **126**, 359-69.
- Quinn, J. C., West, J. D. and Hill, R. E. (1996).** Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev* **10**, 435-46.
- Raman, V., Tamori, A., Vali, M., Zeller, K., Korz, D. and Sukumar, S. (2000).** HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. *J Biol Chem* **275**, 26551-5.
- Ramirez-Solis, R., Zheng, H., Whiting, J., Krumlauf, R. and Bradley, A. (1993).** Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* **73**, 279-94.

- Reddy, T. R. (2000). A single point mutation in the nuclear localization domain of Sam68 blocks the Rev/RRE-mediated transactivation. *Oncogene* **19**, 3110-4.
- Reddy, T. R., Suhasini, M., Xu, W., Yeh, L. Y., Yang, J. P., Wu, J., Artzt, K. and Wong-Staal, F. (2002). A role for KH domain proteins (Sam68-like mammalian proteins and quaking proteins) in the post-transcriptional regulation of HIV replication. *J Biol Chem* **277**, 5778-84.
- Reddy, T. R., Tang, H., Xu, W. and Wong-Staal, F. (2000a). Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene* **19**, 3570-5.
- Reddy, T. R., Xu, W., Mau, J. K., Goodwin, C. D., Suhasini, M., Tang, H., Frimpong, K., Rose, D. W. and Wong-Staal, F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med* **5**, 635-42.
- Reddy, T. R., Xu, W. D. and Wong-Staal, F. (2000b). General effect of Sam68 on Rev/Rex regulated expression of complex retroviruses. *Oncogene* **19**, 4071-4.
- Reneker, L. W., Silversides, D. W., Patel, K. and Overbeek, P. A. (1995). TGF alpha can act as a chemoattractant to perioptic mesenchymal cells in developing mouse eyes. *Development* **121**, 1669-80.
- Resnick, R. J., Taylor, S. J., Lin, Q. and Shalloway, D. (1997). Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene* **15**, 1247-53.
- Reza, H. M., Ogino, H. and Yasuda, K. (2002). L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development. *Mech Dev* **116**, 61-73.
- Richard, S., Yu, D., Blumer, K. J., Hausladen, D., Olszowy, M. W., Connelly, P. A. and Shaw, A. S. (1995). Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol Cell Biol* **15**, 186-97.
- Rieger, D. K., Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. and Olsen, B. R. (2001). A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* **72**, 61-72.
- Ring, B. Z., Cordes, S. P., Overbeek, P. A. and Barsh, G. S. (2000). Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development* **127**, 307-17.
- Rudali, G., Roudier, R. and Vives, C. (1974). The preputial gland of the male mouse.

- Pathol Biol (Paris)* **22**, 895-99.
- Sadler, T. W. (2000). Embryology of the sternum. *Chest Surg Clin N Am* **10**, 237-44, v.
- Saegusa, H., Takahashi, N., Noguchi, S. and Suemori, H. (1996). Targeted disruption in the mouse Hoxc-4 locus results in axial skeleton homeosis and malformation of the xiphoid process. *Dev Biol* **174**, 55-64.
- Safaei, R. (1997). A target of the HoxB5 gene from the mouse nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* **100**, 5-12.
- Sakai, M., Serria, M. S., Ikeda, H., Yoshida, K., Imaki, J. and Nishi, S. (2001). Regulation of c-maf gene expression by Pax6 in cultured cells. *Nucleic Acids Res* **29**, 1228-37.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Margalet, V. and Najib, S. (1999). p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett* **455**, 307-10.
- Sanchez-Margalet, V. and Najib, S. (2001). Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* **183**, 113-21.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**, 2620-34.
- Schatteman, G. C., Morrison-Graham, K., van Koppen, A., Weston, J. A. and Bowen-Pope, D. F. (1992). Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis. *Development* **115**, 123-31.
- Schneuwly, S., Klemenz, R. and Gehring, W. J. (1987). Redesigning the body plan of Drosophila by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia. *Nature* **325**, 816-8.
- Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M. A., Kozak, C. A. and Cepko, C. L. (1999). Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* **24**, 541-53.
- Scott, M. P. (1992). Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* **71**, 551-3.
- Scott, M. P. (1993). A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes. *Nucleic Acids Res* **21**, 1687-8.
- Scott, M. P. and Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that

- control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4115-9.
- Scott, M. P., Weiner, A. J., Hazelrigg, T. I., Polisky, B. A., Pirrotta, V., Scalenghe, F. and Kaufman, T. C.** (1983). The molecular organization of the Antennapedia locus of Drosophila. *Cell* **35**, 763-76.
- Segovia, S. and Guillamon, A.** (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Brain Res Rev* **18**, 51-74.
- Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., Hrstka, R. F. and Graw, J.** (2000). Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* **9**, 1575-85.
- Semina, E. V., Reiter, R. S. and Murray, J. C.** (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* **6**, 2109-16.
- Shen, W. F., Montgomery, J. C., Rozenfeld, S., Moskow, J. J., Lawrence, H. J., Buchberg, A. M. and Largman, C.** (1997). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 6448-58.
- Sherr, C. J.** (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**, 187-90.
- Shi, X., Bai, S., Li, L. and Cao, X.** (2001). Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *J Biol Chem* **276**, 850-5.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q. and Dreyfuss, G.** (1997). Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* **138**, 1181-92.
- Soriano, P.** (1997). The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* **124**, 2691-700.
- Soros, V. B., Carvajal, H. V., Richard, S. and Cochrane, A. W.** (2001). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *J Virol* **75**, 8203-15.
- Spemann HH** (1901). Uber Korrelation in der Entwicklung des Auges. *Vert Anat Ges* **15**, 61-79.
- Stadler, H. S., Higgins, K. M. and Capecchi, M. R.** (2001). Loss of Eph-receptor

- expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs. *Development* **128**, 4177-88.
- Steel, K. P., Davidson, D. R. and Jackson, I. J. (1992). TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* **115**, 1111-9.
- Sudo, H., Takahashi, Y., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B. and Koseki, H. (2001). Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. *Dev Biol* **232**, 284-300.
- Suemori, H., Takahashi, N. and Noguchi, S. (1995). Hoxc-9 mutant mice show anterior transformation of the vertebrae and malformation of the sternum and ribs. *Mech Dev* **51**, 265-73.
- Suzuki, M., Mizutani-Koseki, Y., Fujimura, Y., Miyagishima, H., Kaneko, T., Takada, Y., Akasaka, T., Tanzawa, H., Takihara, Y., Nakano, M. et al. (2002). Involvement of the Polycomb-group gene Ring1B in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* **129**, 4171-83.
- Takahashi, M. and Osumi, N. (2002). Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* **129**, 1327-38.
- Tallquist, MD. and Soriano, P. (2003). Cell autonomous requirement for PDGFR α in populations of cranial and cardiac neural crest cells. *Development* **130**, 507-518.
- Taylor, S. J., Anafi, M., Pawson, T. and Shalloway, D. (1995). Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J Biol Chem* **270**, 10120-4.
- Taylor, S. J. and Shalloway, D. (1994). An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* **368**, 867-71.
- ten Berge, D., Brouwer, A., el Bahi, S., Guenet, J. L., Robert, B. and Meijlink, F. (1998). Mouse Alx3: an aristaless-like homeobox gene expressed during embryogenesis in ectomesenchyme and lateral plate mesoderm. *Dev Biol* **199**, 11-25.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-12.
- Tkatchenko, A. V., Visconti, R. P., Shang, L., Papenbrock, T., Pruett, N. D., Ito, T., Ogawa, M. and Awgulewitsch, A. (2001). Overexpression of Hoxc13 in differentiating keratinocytes results in downregulation of a novel hair keratin gene

- cluster and alopecia. *Development* **128**, 1547-58.
- Tomotsune, D., Shoji, H., Wakamatsu, Y., Kondoh, H. and Takahashi, N.** (1993). A mouse homologue of the *Drosophila* tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by *Hox-C8* in vivo. *Nature* **365**, 69-72.
- Tomotsune, D** (1994). 学位申請論文「マウス *Hox* 遺伝子産物の転写制御下にある遺伝子群」(大阪大学)
- Toyoda, Y., Yokoyama, M., and Hosi, T.** (1972a). Studies on the fertilization of mouse egg *in vitro*. II. Effects of *in vitro* pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs *in vitro*. *Jpn.J.Anim. Reprod* **16**, 152-157.
- Toyoda, Y., Yokoyama, M., and Hosi, T.** (1972b). Studies on the fertilization of mouse egg *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of mouse eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn.J.Anim. Reprod* **16**, 147-151.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R. and van der Kooy, D.** (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032-6.
- Trub, T., Frantz, J. D., Miyazaki, M., Band, H. and Shoelson, S. E.** (1997). The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* **272**, 894-902.
- Turner, E. E., Jenne, K. J. and Rosenfeld, M. G.** (1994). *Brn-3.2*: a *Brn-3*-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron* **12**, 205-18.
- Vachon, G., Cohen, B., Pfeifle, C., McGuffin, M. E., Botas, J. and Cohen, S. M.** (1992). Homeotic genes of the *Bithorax* complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *Distal-less*. *Cell* **71**, 437-50.
- van den Akker, E., Fromental-Ramain, C., de Graaff, W., Le Mouellic, H., Brulet, P., Chambon, P. and Deschamps, J.** (2001). Axial skeletal patterning in mice lacking all paralogous group 8 *Hox* genes. *Development* **128**, 1911-21.
- van Leen, R. W., van Roozendaal, K. E., Lubsen, N. H. and Schoenmakers, J. G.** (1987). Differential expression of crystallin genes during development of the rat eye lens. *Dev Biol* **120**, 457-64.
- Varnum, D. S. and Stevens, L. C.** (1968). Aphakia, a new mutation in the mouse. *J Hered* **59**, 147-50.

- Vernet, C. and Artzt, K. (1997). STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends Genet* **13**, 479-84.
- Vivian, J. L., Olson, E. N. and Klein, W. H. (2000). Thoracic skeletal defects in myogenin- and MRF4-deficient mice correlate with early defects in myotome and intercostal musculature. *Dev Biol* **224**, 29-41.
- Walther, C. and Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-49.
- Wang, L. L., Richard, S. and Shaw, A. S. (1995). P62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **270**, 2010-3.
- Wang, S. W., Kim, B. S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R. L., Klein, W. H. and Gan, L. (2001). Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* **15**, 24-9.
- Wang, Z., Carney, W. P. and Laursen, R. A. (1997). Epitopic characterization of the human wild-type and mutant ras proteins using membrane-bound peptides. *J Pept Res* **50**, 483-92.
- Warot, X., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P. and Dolle, P. (1997). Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development* **124**, 4781-91.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A. T., Robertson, E. J. and Maas, R. (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* **207**, 176-88.
- Wellik, D. M., Hawkes, P. J. and Capecchi, M. R. (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev* **16**, 1423-32.
- West-Mays, J. A., Zhang, J., Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Libby, D., Strissel, K. J. and Williams, T. (1999). AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle. *Dev Biol* **206**, 46-62.
- Wigle, J. T., Chowdhury, K., Gruss, P. and Oliver, G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* **21**, 318-22.
- Wilkinson, D. C.
- Wistow, G. J. and Piatigorsky, J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* **57**, 479-504.
- Witten, W. K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. *Advan. Biosci* **6**, 129-141.

- Wong, R. L., Chan, K. K. and Chow, K. L. (1999a). Developmental expression of Mab2112 during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **87**, 185-8.
- Wong, R. L. and Chow, K. L. (2002a). Depletion of Mab2111 and Mab2112 messages in mouse embryo arrests axial turning, and impairs notochord and neural tube differentiation. *Teratology* **65**, 70-7.
- Wong, R. L., Wong, H. T. and Chow, K. L. (1999b). Genomic cloning and chromosomal localization of the mouse Mab2112 locus. *Cytogenet Cell Genet* **86**, 21-4.
- Wong, Y. M. and Chow, K. L. (2002b). Expression of zebrafish mab21 genes marks the differentiating eye, midbrain and neural tube. *Mech Dev* **113**, 149-52.
- Wozniak, R. W., Rout, M. P. and Aitchison, J. D. (1998). Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol* **8**, 184-8.
- Xu, Y., Baldassare, M., Fisher, P., Rathbun, G., Oltz, E. M., Yancopoulos, G. D., Jessell, T. M. and Alt, F. W. (1993). LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 227-31.
- Yamada, R. (1999). 修士論文「Hox 標的遺伝子 mmab の機能解析」(奈良先端科学技術大学院大学)
- Yang, J. P., Reddy, T. R., Truong, K. T., Suhasini, M. and Wong-Staal, F. (2002). Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Oncogene* **21**, 7187-94.
- Yoshida, T. and Yasuda, K. (2002). Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells* **7**, 693-706.
- Zakany, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X. and Duboule, D. (1997). Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose- dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13695-700.
- Zakany, J., Kmita, M., Alarcon, P., de la Pompa, J. L. and Duboule, D. (2001). Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. *Cell* **106**, 207-17.
- Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G. and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3789-94.
- Zhang, L., Mathers, P. H. and Jamrich, M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is

- essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28**, 135-42.
- Zhang, P.** (1999). The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 655-62.
- Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A. and Elledge, S. J.** (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**, 151-8.
- Zhang, P., Wong, C., DePinho, R. A., Harper, J. W. and Elledge, S. J.** (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev* **12**, 3162-7.
- Zhang, Z., Song, Y., Zhao, X., Zhang, X., Fermin, C. and Chen, Y.** (2002). Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* **129**, 4135-46.
- Zhao, Y. and Potter, S. S.** (2002). Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev Biol* **244**, 21-36.