

**ニワトリ網膜、水晶体の形態形成の過程に
おける胚誘導とホメオボックス遺伝子
Sgx-1 の機能の解析**

百瀬 剛

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

(安田 國雄 教授)

平成11年 1月 7日提出

目次

第一部

Introduction	5
Materials and methods	7
<i>Plasmid Constructs</i>	<i>7</i>
<i>Electroporation</i>	<i>7</i>
<i>Histological analysis</i>	<i>8</i>
<i>Time-course detection of transgene</i>	<i>8</i>
Results	9
<i>Site-restricted expression of the transgene introduced into chicken embryos</i> 9	
<i>Tissue specificity of the transgene expression</i>	<i>15</i>
<i>The expression level of a transgene is concentration-dependent.</i>	<i>17</i>
<i>Timing of the expression of transgenes</i>	<i>19</i>
Discussion	21

第二部

序論	26
<i>生物の複雑な体制の構築</i>	<i>26</i>
<i>胚誘導とモデルシステムとしての眼</i>	<i>27</i>
<i>眼の発生</i>	<i>28</i>
<i>網膜における初期の誘導</i>	<i>31</i>
<i>神経性網膜 - 網膜色素上皮極性の確立と維持</i>	<i>33</i>
<i>網膜の分化に関わる既知のシグナル分子</i>	<i>34</i>
<i>Sgx-1 の同定とその特異的な発現</i>	<i>36</i>
材料と方法	38
<i>Sgx-1 遺伝子のクローニング</i>	<i>38</i>
<i>ニワトリ胚の操作</i>	<i>38</i>

予定水晶体外胚葉除去	38
エレクトロポレーション	39
プラスミド	39
In situ ハイブリダイゼーションとプローブ	41
神経性網膜細胞の初代培養とレポーターアッセイ	41
抗体染色	43
結果	44
Sgx-1 の構造と転写抑制因子としての機能	44
Sgx-1 の水晶体プラコード、眼胞での発現解析	46
Sgx-1 の強制発現による異所的眼杯、水晶体の誘導	49
導入した Sgx-1 のパターンと眼杯の重複の位置関係	53
眼杯の形成(陥入)と神経性網膜の特異化の過程での水晶体プラコードの役割	58
Sgx-1 は水晶体プラコード非存在下で眼胞で発現する	66
Sgx-1 は転写抑制活性をもつ転写因子である	68
Sgx-1 の眼胞における発現は眼杯と水晶体の形成に必要である。.....	68
考察	72
水晶体プラコードは眼杯の陥入と神経性網膜の分化に必要である	72
Sgx-1 は水晶体と眼杯の肥厚陥入に伴って発現する	73
Sgx-1 は水晶体の誘導を制御する	73
Sgx-1 の網膜分化に対する役割	75
Sgx-1 の表面外胚葉での発現は眼胞の陥入に十分であるが、眼胞での Sgx-1 だけでは眼杯の陥入を引き起こすことができない。.....	76
Sgx-1 の発現調節	77
網膜と水晶体誘導のモデル	77
現時点で判っていないこと：シグナルの由来と行き先	78
謝辞	82
引用文献	83
付録(PDF 版のみ)	97

第一部

エレクトロポレーション法による
ニワトリ胚への効率的な局所遺伝子導入

Introduction

The identification of a rapidly increasing number of genes involved in vertebrate development is accompanied by the need to study their functions. A powerful approach for unraveling the molecular mechanisms underlying developmental processes is to ectopically express a gene of interest in embryos and examine the consequences. The avian embryo offers many advantages for developmental studies over other vertebrate embryos as it allows easy access for *in ovo* surgical manipulations such as tissue transplantation as well as implantation of cultured cells and chemically-treated beads for local release of specific humoral factors. The establishment of the chick-quail chimera system provided a powerful tool for tracing the fate of transplanted donor cells (Le Douarin 1973). If one could combine the techniques of such surgical manipulation and localized gene transfer, the chicken embryo would be an outstanding animal model for studying the molecular mechanisms of development.

However, gene transfer techniques for chicken embryos are still quite limited in scope. One of the few available methods is the replication-competent retrovirus vector-mediated gene transfer, which although useful has some serious drawbacks; only coding sequences of less than 2 kb can be packaged into the vector and basically more than one gene cannot be introduced simultaneously (Morgan and Fekete 1996). It takes about 24 hours the proteins encoded in the retroviral vectors to be expressed after manipulation. In addition, postmitotic cells cannot be transfected with retroviral vectors. In this respect, the adenovirus system is advantageous due to its higher efficiency of infection, but as is the case for replication-competent retroviruses, it is difficult to restrict gene expression into a locally specified site (Leber et al. 1996), as well as laborious to prepare the recombinant adenovirus.

The successful use of an *in ovo* electroporation technique has been recently reported (Muramatsu et al. 1996; Muramatsu et al. 1997a) and appears to be an excellent method for the introduction of genes into chicken embryos. This system has the advantage that two or more genes can be simultaneously introduced into cells with no apparent restriction on size of cDNA to be used. However, difficulties remained in controlling the precision and effi-

ciency with which DNA could be targeted to a site for expression. Here we describe a modified version of *in ovo* electroporation. By replacing one of the electrodes with a sharpened tungsten needle, we were able to narrow the electric field, enabling the introduction of DNA into cells within a small area with high reproducibility. It also allowed us to target various tissues originally thought to be refractory for this type of gene transfer, such as mesenchyme. This modified technique promises to be highly useful for the functional study of gene products controlling developmental processes.

Materials and methods

Plasmid Constructs

pCAGGS-GFP and pCAGGS-lacZ were made by excising the GFP and lacZ coding sequences from pCMX-SAH/Y145F (Ogawa and Umesono, 1998) and pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), respectively, and insertion into the blunted EcoRI site of an expression vector pCAGGS (Niwa et al. 1991). RCASBP-Tbx5/GFP is described elsewhere (J.T. et al., submitted). Plasmid DNA was purified using a plasmid purification kit (QIAGEN, Germany) and dissolved in T1/4E (Tris-HCl (pH.8.0) 10 mM, EDTA 0.25 mM). Before injection, DNA was diluted to the appropriate concentration with T1/4E and colored with 0.05% methylgreen (Nakalai Tesque, Kyoto). Unless otherwise specified, pCAGGS-lacZ was used at a concentration of 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and pCAGGS-GFP at 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Electroporation

The electro-square porater BTX T-820 (BTX, San Diego, USA) was used to generate electric pulses under control of a pulse monitor MVC540R (Meiwa Shoji, Osaka, Japan). A platinum electrode (Muramatsu et al. 1996) was made from platinum wire ($\phi = 0.3 \sim 0.5$ mm). The tungsten “microelectrode” ($\phi = 40 \mu\text{m}$ at the tip, Fig.1B) was sharpened in hot fused sodium nitrite (Hamburger 1942) and held by a holder (Fig.1B) connected to the electro-square porater.

Fertilized white Leghorn eggs were incubated horizontally at 38.5°C. Embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (1951). Before manipulation, 3~4 ml of albumen was removed and the top of the shell elliptically cut with scissors to open a window over the embryo (Selleck 1996; Stern 1993). Hank's saline was used to wet the embryo and electrodes, so that the resistance between the electrodes decreases to around 0.5~1.0 kW. For the conventional method, electrodes were placed on both sides of the embryo, the DNA solution was injected over the target cells with a glass capillary and an electric-field was applied (Muramatsu et al. 1996). For microelectroporation, only the platinum electrode connected to

the red lead (anode) was set prior to DNA injection. DNA was injected as above. A tungsten microelectrode connected to the black lead (cathode) was inserted into the embryo close to the target cells so that the microelectrode, injected DNA solution, target cells and the anode are aligned on a straight line in this order. The conditions of the electric pulse (*i.e.* Voltage, Pulse length) are described with each experiment. The window in the shell was sealed with plastic tape and embryos were incubated until the desired stages.

Histological analysis

Embryos were fixed in 4%PFA/PBS for 1 hour for observation of GFP fluorescence or β -gal fixative (0.2% glutaraldehyde, 0.4% paraformaldehyde, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 0.02% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40) for 30 minutes. GFP epifluorescence was observed under a MZ FL III fluorescence microscope (Leica K.K., Tokyo) for whole mounts or embryos were sectioned (100 μm) with a microslicer (Dosaka E.M., Kyoto) and observed by confocal microscopy (Yokogawa Electric Co., Tokyo). β -galactosidase (β -gal) activity was visualized by X-gal staining (Hogan et al. 1986) with slight modification, in which ferricyanide and ferrocyanide concentrations were increased to 20 mM each. X-gal reactions were carried out at 30°C for 4 hours. Following the X-gal staining, 15 μm paraffin sections of the embryos were prepared.

Time-course detection of transgene

pCAGGS-GFP was introduced by microelectroporation as described above. The embryos were incubated at 38.5°C after electroporation. The plastic seal on the window was removed and photographs were taken under the fluorescence microscope as mentioned above (10 seconds exposure). Bright field photographs were taken to identify the position of the embryo. The window was resealed and incubation continued. The procedure was completed within 5 minutes so that the development of the embryo was not disturbed.

Results

Site-restricted expression of the transgene introduced into chicken embryos

First we tested whether we could successfully transfer reporter genes into the optic vesicle of stage 10~11 embryos by the reported method. DNA solution containing lacZ expression plasmids (pCAGGS-lacZ) was microinjected into the cavity of the optic vesicle (Fig. 1A). A few drops of Hank's saline were added to cover the electrodes and an electric field applied (2 mm gap platinum electrode, 15 V, 50 msec, 3 pulses). Electroporated embryos were incubated for a further 24 hours until they reached stage 16~17. Only 30% of the electroporated embryos were alive after the incubation period (Table 1) and examination for β -gal activities revealed a few cases where β -gal-positive cells could be observed in the optic vesicle (Fig 2A). In most specimens, however, no β -gal-positive cells were observed (Table 1, Fig. 2E). Thus, the efficiency of gene incorporation or expression appeared quite sporadic in our hands. Moreover, β -gal-positive cells were widely scattered over a broad region covering the diencephalon, midbrain and epidermis as well as the optic cup (Fig 2A). We further tested viability of embryos using this method, changing the strength of the electric field: no embryos survived 24 hours under severe conditions, (25 V for 2 mm gap), whereas almost all of them survived under milder conditions (10 V for 2 mm gap), but there was no increase in efficiency of gene transfer.

In order to express transgenes in a more region-specific and efficient manner, we narrowed the application of the electric field to the vicinity of the target tissue by replacing one of the electrodes with a sharpened tungsten needle. After injection of the DNA solution into the optic vesicle, the tungsten microelectrode was inserted through the anterior neuropore into the vesicle so that the tip of the microelectrode was located beneath the optic vesicle (Fig. 1A). This microelectrode was connected to the cathode and the platinum electrode to the anode, which was placed approximately 1 mm lateral to the embryo. An electric pulse was applied twice at 7 V for 25 msec. The window was sealed and embryos were allowed to develop for a further 24 hours. Overall viability was approximately 90% after the incubation

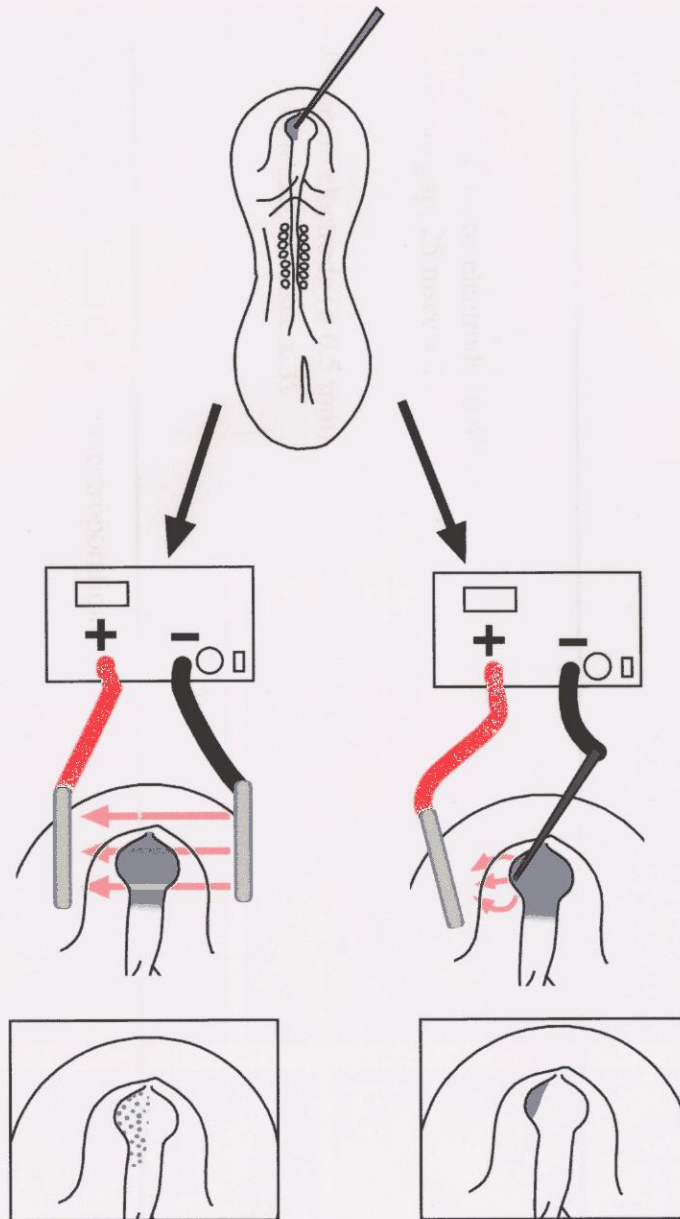
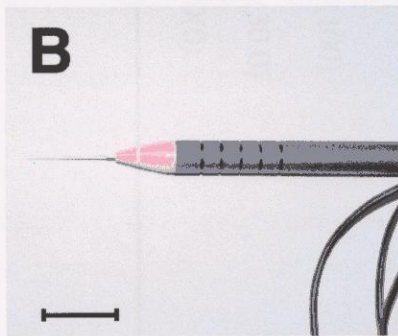
A**B**

Fig.1 Schematic representation of the electroporation technique and its instruments. (A) For conventional electroporation (Left), DNA solution is injected around the target tissue and an electric pulse is charged using two platinum electrodes located on both sides of the embryo. In the modified method (Right), an electric pulse is applied by using a thin tungsten electrode (microelectrode) near the target tissue. The microelectrode is always connected to the negative electrode of the electric pulse generator. (B) Microelectrode sharpened to $50\mu\text{m}$ or less is encased in plastic and connected to the cathode.

Table 1. Comparison between the microelectroporation and the previous method in the gene transfer efficiency.

Electrode	Voltage	Number of embryos	Live embryos ^a (variability %)	Embryos b-gal-positive in optic cup ^a (efficiency %)
Tungsten micro-electrode (ϕ 40 μ m) (1 mm gap, 25 msec x 2)	7	28	25 (89.2)	25 (89.2)
Platinum electrode (ϕ 0.5 mm) (2 mm gap, 50 msec x 3)	10	7	7 (100)	1 (14.3)
	15	20	6 (30.0)	3 (15.0)
	25	6	0(0)	0(0)

a: assessed 24 hours after the electroporation

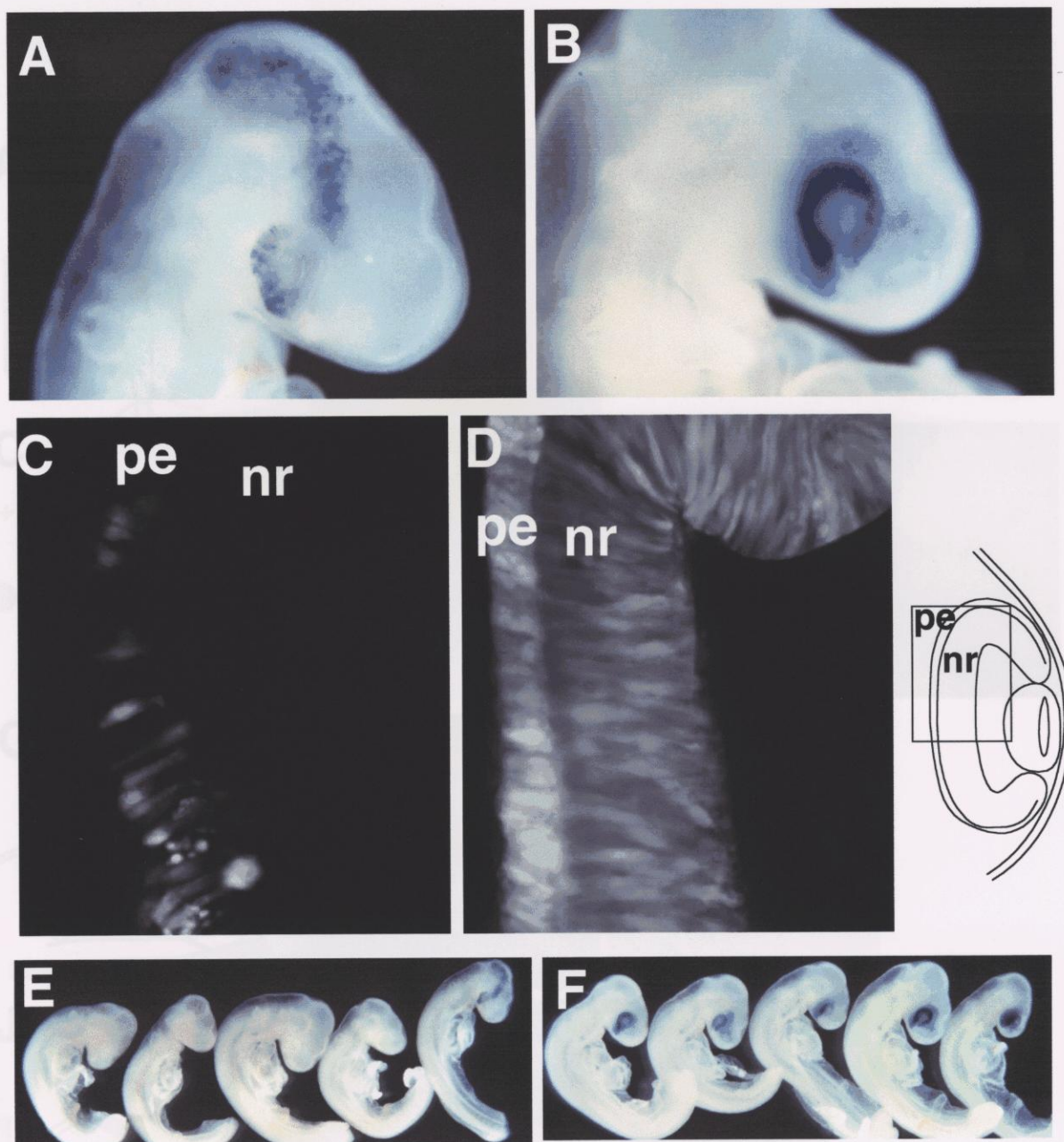


Fig.2 Comparison of transgene incorporation into optic vesicle between the previously reported method and microelectroporation . (A, C, E) Conventional electroporation: lacZ and GFP expression plasmids were injected into the optic vesicle at stage 11 and a 15 V, 50 msec pulse was applied three times. (B, D, F) Microelectroporation: DNA solution was injected into the optic vesicle and a 7 V, 25 msec pulse was applied twice. (A, B) Whole mount X-gal staining to show transgene distribution after conventional electroporation or microelectroporation. Embryos are viewed laterally. (C, D) GFP expression in neural retina and pigment epithelium. Observation of GFP fluorescence in a 100 μ m frontal section by confocal microscopy . Top is dorsal. Strong fluorescence was detected in both neural retina and pigment epithelium in (C). Pycnotic GFP signal was detected in pigment epithelium layer in (D). nr, neural retina; pe, retinal pigment epithelium. (E, F) Fluctuation of transgene expression patterns between individual embryos.

Fig. 2 Specific expression of transgene in various types of tissues by microelectroporation. (A) Transferring catheter (C) and microelectrode (E) was placed around the ectoderm and mesoderm, respectively. (B) *β-gal* expression is induced in (A) viewed laterally. *β-gal* expression is induced in surrounding ectoderm. (C) Otic vesicle (ot) and VIII g. (VIII ganglion) are shown. (D) *β-gal* expression is induced in (C) viewed laterally. (E) Transferring catheter (C) and microelectrode (E) was placed around the inner ear. (F) *β-gal* expression is induced in (E) viewed laterally. (G) Transferring catheter (C) and microelectrode (E) was placed around the inner ear. (H) *β-gal* expression is induced in (G) viewed laterally. (I) *β-gal* expression is induced in (G) viewed laterally. (J) Transferring catheter (C) and microelectrode (E) was placed around the inner ear. (K) *β-gal* expression is induced in (J) viewed laterally. (L) *β-gal* expression is induced in (J) viewed laterally. (M) Transferring catheter (C) and microelectrode (E) was placed around the inner ear. (N) *β-gal* expression is induced in (M) viewed laterally. (O) *β-gal* expression is induced in (M) viewed laterally.

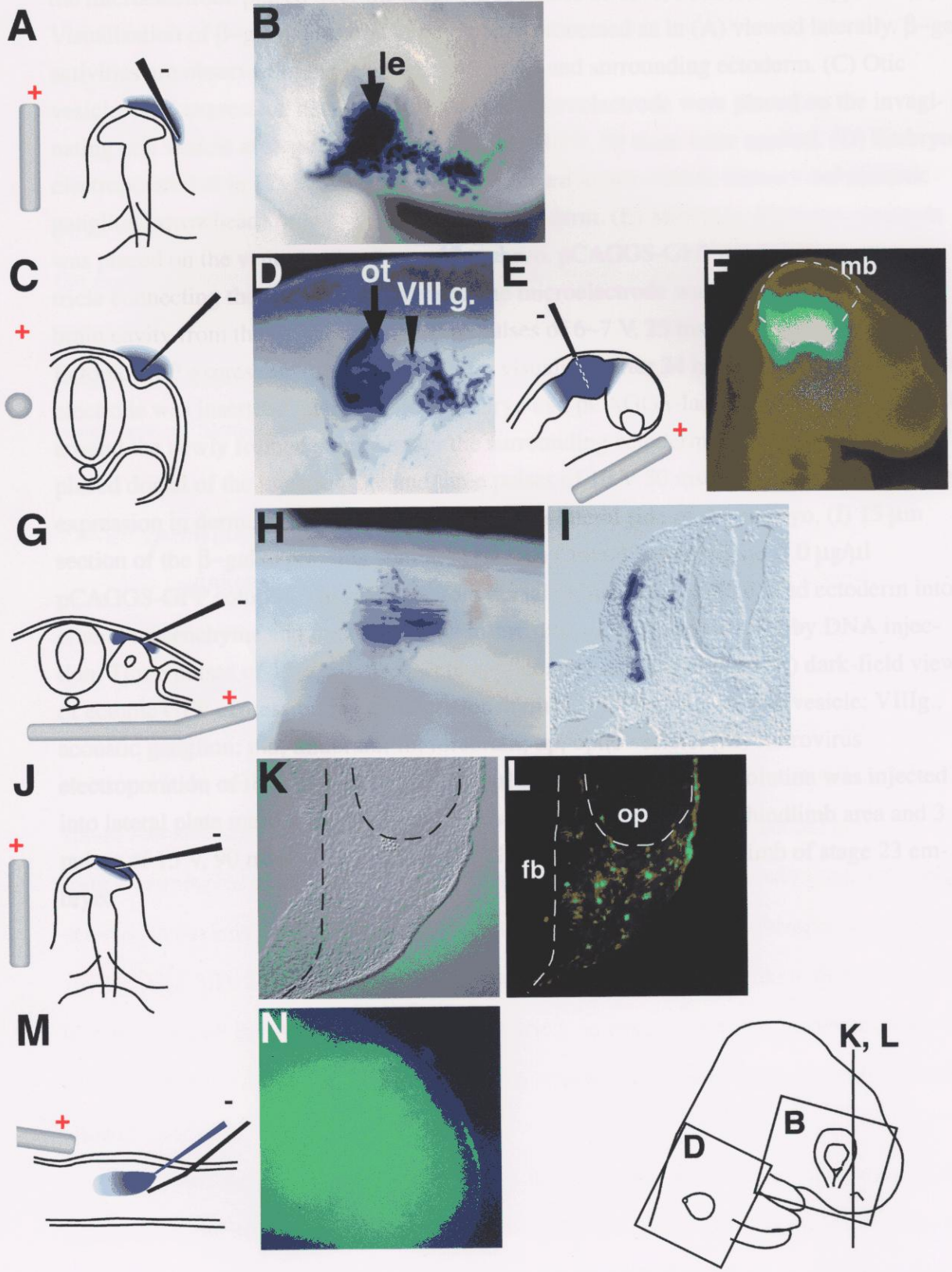


Fig.3 Specific expression of transgene in various types of tissues by microelectroporation. (A) Lens-forming ectoderm. pCAGGS-lacZ solution was placed around the ectoderm and the microelectrode placed over the area. Three pulses of 15 V, 50 msec were applied. (B) Visualization of β -gal expression of an embryo processed as in (A) viewed laterally. β -gal activities are observed in the lens vesicle (arrow) and surrounding ectoderm. (C) Otic vesicle. lacZ expression plasmid and the tip of microelectrode were placed on the invaginating otic vesicle at stage13 and three pulses of 10 V, 50 msec were applied. (D) Embryo electroporated as in (C) β -gal signals were detected in otic vesicle (arrow) and acoustic ganglion (arrowhead) as well as surrounding ectoderm. (E) Midbrain. Platinum electrode was placed on the ventral side of stage12 embryo. pCAGGS-GFP was injected into ventricle connecting the forebrain-hindbrain. The microelectrode was inserted into the midbrain cavity from the dorsal midline. Two pulses of 6~7 V, 25 msec were applied. (F) Ectopic GFP expression in ventral midbrain visualized after 24 hrs. (G) Somites. Platinum electrode was inserted beneath stage13 embryo and pCAGGS-lacZ (2 μ g/ μ l) was injected around the newly formed somite under the surrounding ectoderm. Microelectrode was placed dorsal of the injection site and three pulses of 10 V 50 msec were applied. (H) β -gal expression in dermomyotome viewed from dorso-lateral side of the embryo. (I) 15 μ m section of the β -gal expressing somite in (H). (J) Cranial mesenchyme. 5.0 μ g/ μ l pCAGGS-GFP solution was injected from dorsal or lateral side of the head ectoderm into cranial mesenchyme and microelectrode inserted near the wound formed by DNA injection. Three pulses of 15 V, 50 msec were applied. (K) Bright-field and (L) dark-field views of ectopic GFP expression in cranial mesenchymal cells. le, lens; ot, otic vesicle; VIIIg., acoustic ganglion; mb, midbrain; fb, forebrain; op, optic vesicle. (M) Retrovirus electroporation of limb mesenchyme. 5 μ g/ μ l RCASBP-Tbx5/GFP solution was injected into lateral plate mesoderm that will give rise to mesenchyme in the hindlimb area and 3 pulses of 15 V, 90 msec were applied. (N) GFP fluorescence in hindlimb of stage 23 embryo.

period. (Table 1) Examination for expression of the introduced lacZ gene in these microelectroporated embryos revealed that almost all of these embryos had many β -gal positive cells which were spatially restricted to the optic vesicle and adjacent ventral forebrain (Fig. 2B and 2F, Table 1A).

We further compared the distribution of transgene-expressing cells in the optic cup by introducing green fluorescence protein (GFP) expression plasmid, pCAGGS-GFP. When pCAGGS was electroporated by the previously reported method, about 5~10% of the cells in the pigment epithelium expressed GFP judged by the fluorescence and no GFP expression was detected in the neural retina (Fig. 2C). In contrast, when pCAGGS-GFP was introduced by microelectroporation, almost all the cells located in the central retina and pigment epithelium were uniformly GFP-positive (Fig. 2D).

Tissue specificity of the transgene expression

The technique presented here can be used to introduce DNA not only into the optic vesicle but also into other tissues such as sensory placodes, surface ectoderm, neuroepithelium of CNS, somites and limb mesenchyme.

Lens placode: The microelectrode was placed near the presumptive lens ectoderm (PLE) at stage 10~11 and DNA solution was applied between PLE and the microelectrode. The anode was placed on the opposite side of the embryo (Fig. 3A) and an electric pulse (10 V, 50 msec) was applied three times. After 24 hours of incubation, β -gal activity could be strongly detected in the lens vesicle and also in the ectoderm located nasally and temporally to the lens vesicle (Fig. 3B). This naso-temporally-extended expression seems likely due to the direction with which the microelectrode was inserted. In cases where the microelectrode was inserted from the dorsal side, the ectodermal expression expanded dorso-ventrally (data not shown).

Otic vesicle: A similar approach can be applied to the otic vesicle. DNA solution was injected into the invaginating otic placode at stage 13~14 and a microelectrode (cathode) was placed on the otic pit (Fig. 3C). A low pulse was applied (7 V, 25 msec, 2 pulses) and the

embryo was incubated for 24 hours. The otic vesicle and acoustic ganglion, derivatives of the otic placode, expressed β -gal strongly (Fig. 3D). In some cases, we observed a strong β -gal signal in the surface ectoderm near the otic vesicle, apparently due to leakage of the injected DNA solution.

Midbrain: DNA could also be successfully introduced into neuroectodermal cells covered by other tissues, such as those in the midbrain, without destroying surrounding tissues by inserting the electrode near the target cells. The dorsal side of the midbrain was punctured and a DNA solution was injected at stage 13, followed by application of an electric pulse using an inserted microelectrode (Fig. 3E). The voltage and pulse length were decreased (2 pulses at 7 V, 25 msec) to prevent damage by the bubbles formed at the cathode. By this method, even though the injected DNA solution spread from the forebrain to hindbrain region, only the midbrain was found to be positive for expression of the transgene (Fig. 3F). Interestingly, strong GFP fluorescence was observed on the ventral side of the midbrain, probably because the microelectrode was inserted from the dorsal side and the DNA moved towards the ventrally placed anode.

Somite: To target somites, we injected DNA between the newly formed somite and the overlying ectoderm of a stage 13 embryo. The anode was placed beneath the embryo and the microelectrode was inserted under the ectoderm (Fig. 3G). An electric pulse of 10 V, 50 msec was applied three times and the embryo incubated for a further 36 hours. β -gal signals were detected in the myotomal cells spanning a segmented somite along the anterior-posterior axis (Fig. 3H, I) and dispersed signals were also detected in dermatomal cells (Fig. 3H). In some embryos, a few sclerotomal cells also displayed β -gal activity (Fig. 3I).

Cranial mesenchyme: To target cranial mesenchyme, we injected DNA into the mesenchymal space surrounding the optic vesicle at stage 12. To overcome the problem that only a small volume of DNA can be injected into the mesenchyme compared to the volume that can be injected into the ventricles for targeting epithelial cells such as those in the optic vesicle, we injected a more concentrated solution of pCAGGS-GFP plasmid (5 μ g/ μ l). The microelectrode was placed near the hole made by the glass capillary and a strong (20 V, 50 msec)

electric pulse was applied three times (Fig. 3J). The embryos were then incubated further for 24 hours. In histological sections many GFP-positive mesenchymal cells were found surrounding the optic vesicle and nasal pit (Fig. 3K, L).

Limb mesenchyme: We also attempted to introduce replication-competent recombinant retroviral DNA RCASBP-Tbx5/GFP which encodes GFP fused to a transcription factor Tbx5. The DNA solution was injected into the lateral plate mesoderm at the level of the prospective hind limb at stage 9. The anode was placed antero-laterally to this region, the microelectrode was inserted medially towards the target region and 1~3 pulses of 12~17V, 90 msec were applied (Fig. 3M). The embryo was reincubated and harvested at stage 23. Intense GFP fluorescence was observed uniformly throughout the limb mesoderm (Fig. 3N).

The expression level of a transgene is concentration-dependent.

We examined whether the level of transgene expression mediated by electroporation is dependent on the concentration of injected DNA. The GFP and lacZ expression vectors were mixed and electroporated into the head ectoderm at stage 10~11. pCAGGS-GFP was used at concentrations of 0.05, 0.25, and 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ whereas the concentration of pCAGGS-lacZ was fixed at 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in order to assess the electroporation efficiency. The levels of GFP epifluorescence were compared between areas with similar levels of β -gal expression.

At equal ratios of GFP: lacZ expression plasmids, the distribution of GFP-positive cells was virtually identical to that of β -gal-positive ones (Fig. 4B, 4E). This clearly demonstrates that more than one gene can be simultaneously introduced into the same area of an embryo. When the concentration of GFP DNA was raised to 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, the strength of the GFP fluorescence greatly increased and could be detected even in β -gal-negative cells (Fig. 4C, 4F, arrowheads). By contrast, at a GFP DNA concentration of 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, the level of fluorescence was much lower or not detectable in the cells that strongly expressed β -gal (Fig. 4D, arrow). Following longer exposure (20 seconds, Fig. 4G), these β -gal-positive regions were found to be also positive for GFP, albeit at levels under the detection limit in the shorter exposure. From these results, we conclude that the expression level of the transgene is depen-

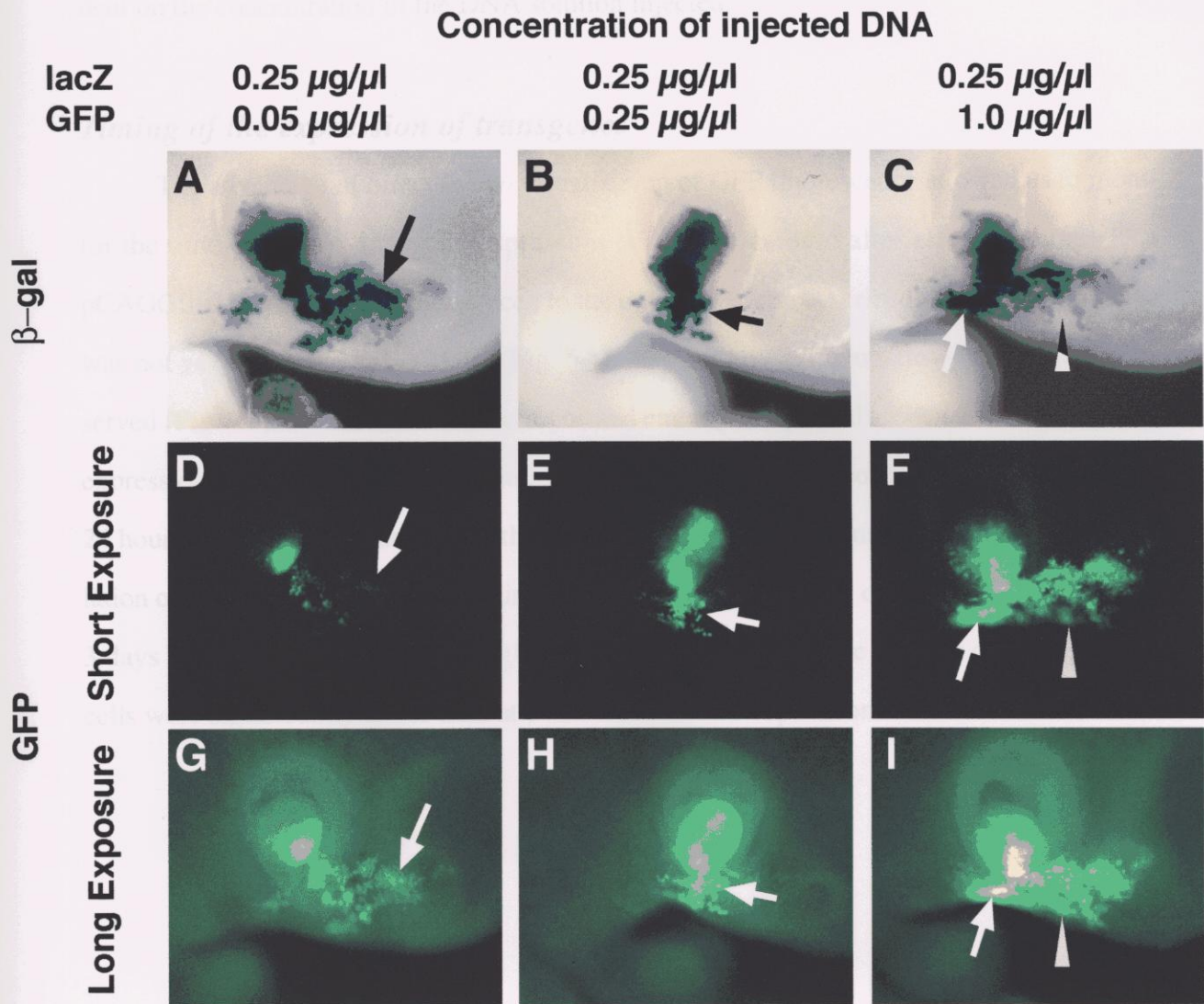


Fig.4 Quantitative regulation of transgene products by changing the concentration of DNA solution. 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A, D and G), 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B, E and H) or 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (C, F and I) GFP expression plasmid was co-electroporated into the embryos with 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lacZ expression plasmid. β -gal expression is shown in (A, B and C). GFP fluorescence as detected by a 10-seconds (D, E, F) and 20-seconds exposure (G, H, I) prior to β -gal detection. Arrows indicate regions that show a comparable level of β -gal.

dent on the concentration of the DNA solution injected.

Timing of the expression of transgenes

The advantage of direct *in ovo* visualization of GFP fluorescence allowed us to monitor the time-course of transgene expression in a single embryo after electroporation. The pCAGGS-GFP plasmid was introduced to the optic vesicle as described above. Fluorescence was not yet detectable at 1.5 hours (Fig. 5A), however, by 2.5 hours, low levels can be observed (Fig. 5B). By 8 hours, the electroporated embryos displayed significant levels of GFP expression (Fig. 5C, 5D), and the intensity of GFP fluorescence continued to increase up to 24 hours (Fig. 5E). This increase in the fluorescence intensity seems integral due to accumulation of the stable GFP protein within cells. Transgene-expressing cells were still observable 3 days after electroporation, although the expression level and the number of GFP-positive cells were significantly lower than at 24 hours after electroporation.

Discussion

The electroporation technique in general has been used for introducing DNA into a wide variety of cell types, including bacteria, yeast and animal cells. The method relies on the transient generation of pores in the plasma membrane, which allows macromolecules to per-

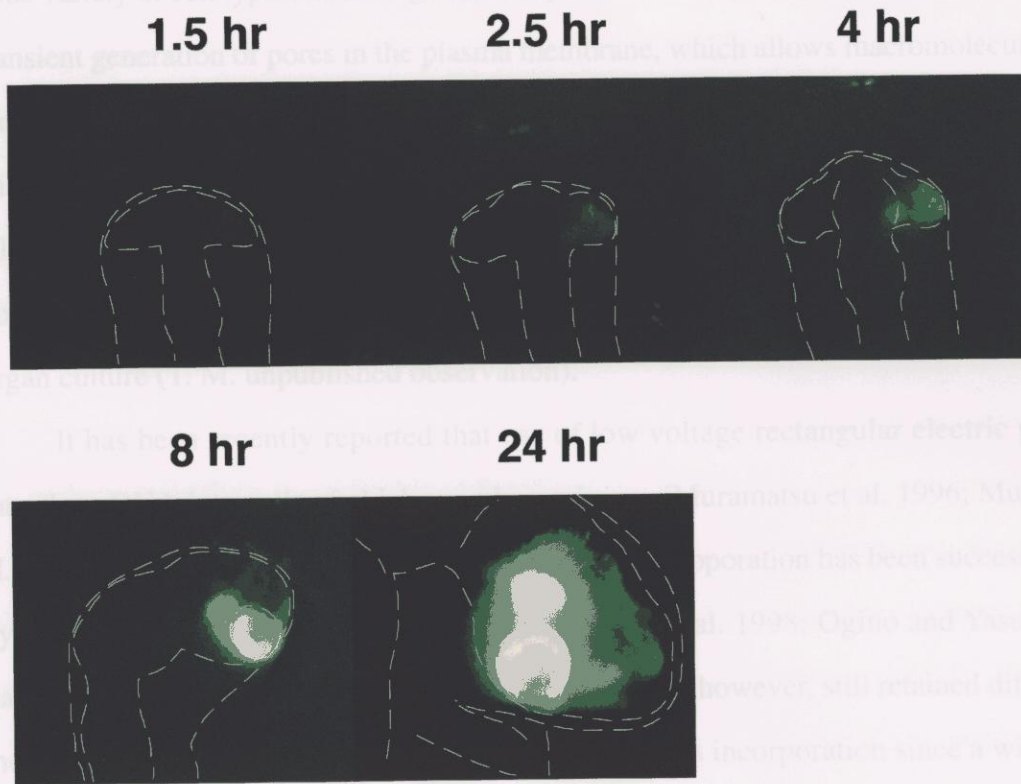


Fig.5 Time course of the detection of GFP fluorescence after electroporation. pCAGGS-GFP was introduced into the optic vesicle by microelectroporation and incubation resumed shortly after. GFP expression of an embryo photographed *in ovo* at (A) 1.5 hours, (B) 2.5 hours, (C) 4 hours, (D) 8 hours and (E) 24 hours after electroporation. Exposure times were fixed at 10 seconds except for (E) which was decreased to 5 seconds.

The increased efficiency of DNA introduction, reproducibility of tissue targeting and higher survival rate for embryos over the previously described methods can be attributed to

Discussion

The electroporation technique in general has been used for introducing DNA into a wide variety of cell types, including bacteria, yeast and animal cells. The method relies on the transient generation of pores in the plasma membrane, which allows macromolecules to penetrate into the cytoplasm (Neumann et al. 1982; Potter et al. 1984). However, application of an electric field under such conditions (1 kV/cm~10 kV/cm at the peak) to organ cultures or whole embryos causes damage due to destruction of cell-cell interactions. For example, we noticed that electroporation disrupts the apical-basal polarity of neural retinal epithelium in organ culture (T. M. unpublished observation).

It has been recently reported that use of low voltage rectangular electric pulses can introduce DNA into cells of chicken embryos *in ovo* (Muramatsu et al. 1996; Muramatsu et al. 1997a; Muramatsu et al. 1998) and this type of electroporation has been successfully used by several groups (Muramatsu et al. 1997b; Ochiai et al. 1998; Ogino and Yasuda 1998b; Sakamoto et al. 1998; Suzuki et al. 1998). This method, however, still retained difficulties in the accuracy by which one could target the site of DNA incorporation since a wide electric field is applied to the embryo through relatively large (0.5 mm ϕ x 4~12 mm) platinum electrodes. Moreover the viability of the electroporated embryos is low due to the toxicity of the electric current on the embryo.

We thus attempted to reduce the area of the electric field by using a sharpened electrode of about 40 μ m in diameter (microelectrode) and inserting this directly adjacent to the targeted area. With this microelectrode-mediated *in ovo* electroporation, which we call “microelectroporation”, we observed that DNA could be introduced and expressed exclusively in the target cells. Since the distribution of injected DNA solution was similar between our microelectroporation method and previous methods, the difference in the distribution of transgene expression appears to result from the local restriction of the electric field around the tip of the microelectrode.

The increased efficiency of DNA introduction, reproducibility of tissue targeting and higher survival rate for embryos over the previously described methods can be attributed to

the following: 1) Insertion of the electrode into the embryo allows direct application of the electric fields to target cells, avoiding interference from other insulating tissues. 2) Likewise, this allows more precise control over the region to be targeted. 3) The higher efficiency of the method means that a lower concentration or a smaller volume of DNA can be used, facilitating the targeting of tissues such as mesenchyme. 4) Restriction of the range of the electric field reduces overall toxicity and allows electroporation of embryos of earlier stages.

We observed that injection of a mixture of lacZ and GFP expression plasmids results in coexpression of both genes, indicating that a single cell can incorporate more than one gene simultaneously by microelectroporation, in contrast to the retroviral system which permits introduction of only one gene. This gives us the potential to introduce two or more genes into the embryo to analyze their combined functions and interaction.

In addition, the retroviral system usually requires 24 hours for transgene expression. We were able to detect the transgene products less than 2.5 hours after electroporation. This rapid expression is likely due to the physical introduction of DNA into the cells. Between 4 to 8 hours after microelectroporation with the GFP expression plasmid, electroporated embryos displayed a significant level of GFP fluorescence. The short interval required to obtain a high level of localized gene expression allows us greater flexibility in the choice of target embryonic tissues which are rapidly developing.

In our experiments, expression level of GFP reached its peak intensity at 24 hours after the electroporation and gradually decreased thereafter. This is likely the result of degradation and/or dilution of the plasmid DNA during cell proliferation, as the plasmid DNA is not incorporated into the host chromosomal DNA. Similar observations were reported previously (Muramatsu et al. 1997b). If one wished to establish stable misexpression of the transgene product in the developing embryo, it would be necessary to integrate the DNA into the genome of the target cells. This appears possible by electroporation of a retrovirus vector containing the gene to be expressed. By this method, introduced DNA becomes incorporated into the host genome by the integrase activity encoded in the vector (Varmus and Brown 1989; Whitecomb and Hughes 1992). We electroporated a retrovirus vector DNA into chick em-

bryos and were able to observe strong transgene expression which was maintained for more than 3 days in the targeted tissue (J.T. et al., submitted). This “retroviral-electroporation” possesses advantages over the conventional retroviral infection method: 1) The retrovirus vector DNA is directly introduced into embryos, therefore no virus particle preparation is required, nor does one need to worry about fluctuating titers. 2) Initiation of transcription of retrovirus-electroporated genes appears to require a much shorter interval than the conventional retrovirus-infection method (J.T. et al, submitted).

In this study, we introduced GFP or lacZ reporter plasmids which are driven by CAG, a strong chimeric promoter that is constitutively active in various types of cells. Promising future applications include use of this electroporation method to test the activities of native promoters fused to such GFP or lacZ reporter genes. This would be a very quick and easy method to test multiple constructs for the presence of regulatory enhancer elements compared to the time, labor and cost involved in making transgenic “blue” or “green fluorescent” mouse lines. Use of the GFP reporter gene would allow one to follow the stage-dependent activity of individual promoter *in ovo*.

The data we presented here showed the introduction of DNA plasmids. Since electroporation introduces DNA into the cell cytoplasm by spontaneous or electrophoretic inflow, other negatively charged macromolecules including RNA, oligonucleotides and antibodies can also be introduced by electroporation (Okada et al. 1986). If one wished to obtain even more rapid expression of a transgene than that presented here by DNA electroporation, injection of *in vitro* synthesized mRNA (Melton 1984) should result in almost immediate translation into protein after electroporation. Antisense oligonucleotides and antibodies offer the potential to block the function of specific genes *in ovo*.

Some of the problems that remain to be solved include the relatively low efficiency of electroporation for mesenchyme as compared to epithelial cells and the damage caused to fragile embryonic tissues by bubbles of hydrogen gas that occasionally form on the micro-electrode. The latter appears to be alleviated by the use of tungsten needles for both electrodes (T.M. personal observations). These problems are likely to be overcome in the near

future with further improvements over this technique. Overall, microelectroporation appears to offer tremendous potential for efficient introduction of DNA into various kinds of cells in a temporal and region-specific manner. With the combination of microelectroporation with microsurgical manipulation, the avian embryo is a powerful tool for analyzing the molecular mechanisms underlying the embryonic development.

第二部
網膜及び水晶体の誘導と
転写因子 Sgx-1 の機能

序論

本研究では、胚発生の過程における分化と形態形成の制御メカニズムについて、網膜の発生過程をモデルシステムとして用い、明らかにしようと試みる。多くの組織の中でなぜ眼をもちいるのか、眼の発生についてどのようなことが理解されているのかについて、まず簡単に概説する。

生物の複雑な体制の構築

多細胞生物、つまり多種多様な細胞から構成される複雑な体制を持つ生き物たちも、時を遡れば元々は必ず一つの受精卵に行き着く。たった一つの細胞とそれを取り囲む卵の構造の中に、成体の複雑な構造を生み出すどのような設計図が存在し、それがどのようにして実行され、複雑な成体の構造を生むのだろうか？それは生命の進化の過程でどのようにして獲得されてきたのだろうか？発生生物学とは私達人間にとって身近な問題でありながら、その問題の多くは未だ答えられていない。

ショウジョウバエのホメオティック遺伝子(Hox 遺伝子)の発見によって、昆虫の体は単純な節の繰り返しによって構成され、その節それぞれがホメオティック遺伝子の制御の下で位置に応じた性格を獲得することが分かってきた。Hox は昆虫のみならず、脊椎動物にも存在していることが明らかになり、我々の体も、基本的な繰り返し構造と特異化にという原理によって支配されていることが示唆されている。ホメオティック遺伝子の発見を祖とする発生遺伝学が遺伝子による発生支配のネットワークを明らかにしてきた一方で、細胞や組織、最近では分子のレベルでの発生のメカニズムや原理は実験発生学によって明らかにされてきた。実験発生学では胚体から特定の組織を取り除いたり、外来の組織などを移植することで、ある細胞(組織)が周囲の細胞の分化や組織の形態形成にどのように影響しているのか、周囲からどのような影響を受けるのかを調べることができる。

Spemann と Mangold は原腸陥入の際に原口背唇部の細胞を腹側に移植すると、そこに新たに陥入を生じ、移植した先に二次胚軸を形成することを発見した(Speman and Mangold, 1924)。移植片そのものだけでなく、移植した先(ホスト)の

細胞から二次胚が形成されることから、彼らは原口背唇部には周囲の細胞に働きかけて体軸形成を引き起こす能力があると考え、この領域を Organizer(オーガナイザー、形成体)と呼んだ(Spemmann 1938)。オーガナイザーの示す意味は、胚発生の過程で、細胞の運命は最初に自律的に決まっているのではなく、周囲からの働きかけ、「誘導」によって制御される、という点にある。このような、ある組織が別の組織(細胞)に働きかけて、細胞の運命や組織形態に影響を及ぼす過程を「胚誘導」とよぶ。

胚誘導とモデルシステムとしての眼

オーガナイザーによる最初の体軸(body axis)の誘導を一次誘導という。オーガナイザーは体制を全てを決めているわけではなく、胚は一次誘導の後、それを受けて二次、三次と更に幾重にも誘導が繰り返し、次第に複雑な体制を構築していく。オーガナイザーの報告に先立つこと20年、1904年に、Spemmannは誘導という概念を初めて報告しているが、そこではカエル(*Rana fusca*)の水晶体における誘導であった。水晶体が形成される前のカエル胚から眼杯(将来網膜を形成する)を切除して取り除いた場合、水晶体が形成されないことを見だし、水晶体形成に眼胞の存在が必要であることを証明した(Spemmann, 1901)。その後Lewisは眼胞を本来水晶体を形成しない頭部の表皮外胚葉に移植すると、体幹部の表皮外胚葉から水晶体が分化することを示し、眼胞からの誘導が表皮外胚葉の水晶体への分化に十分であることを示唆した(Lewis, 1904)。

Lewisの実験が示唆する、眼胞が一義的に表皮外胚葉から水晶体の形成を決定するという、眼胞による命令的(instrucive)な誘導モデルはつい最近まで信じられてきたが、近年Grainger等のグループは宿主-供与体標識を行うことにより、Lewisの実験において分化した水晶体は供与体由来であり宿主からは水晶体が誘導されていないことを明らかにした(Grainger et al., 1988)。彼らは眼胞は水晶体の誘導に十分ではないことを示すとともに、水晶体分化が眼胞によって誘導される以前に、神経板外胚葉・間充織等などによる段階的な誘導が存在し、水晶体の分化に重要な役割を担っていることを示した(Henry and Grainger, 1987; Henry and

Grainger, 1990)。眼胞が水晶体分化に必要なのは紛れもない事実であるが、水晶体形成に先立って外胚葉の比較的広い領域が水晶体分化コンピテンスを獲得し、その中から神経板などからのシグナルによって水晶体分化能を増強した(水晶体バイアス)細胞誘導される。眼胞からの誘導によって、そこから水晶体細胞への分化が決定された細胞が生まれてくると考えられている(総説 Grainger, 1992; 図 6)。

Grainger による実験発生学的な裏付けがあるにもかかわらず、現在のところ水晶体誘導の分子メカニズムについては分かっていない。そこで、このような実験発生学的な情報をもとに、分子生物学的な手法を用いて、誘導のメカニズム、すなわちどのような誘導分子が作用し、その結果どのような影響を誘導される側の細胞に及ぼすかを明らかにしようと考えた。眼の発生過程における誘導の分子メカニズムを明らかにし、一次誘導をはじめとする初期の誘導に関する知見と比較することによって、発生過程を通して生物のかたちづくりを支配する誘導の原理について理解できるようになるだろうと期待される。

眼の発生

動物の多くは環境の情報の多くを視覚に頼っている。嗅覚や聴覚同様、視覚は周囲の危険を察知したり、食餌を見つけだしたりする手段として重要である。脊椎動物の眼のかたちはかれらの住む環境に応じて驚くほど多様であるが、そこには基本となるデザインが存在している。

眼球の側方部(最も体表面に近い側)に角膜、光彩がある。ここを通して目に入った光は水晶体で屈折される。眼球内を満たすガラス体を通った光は近位部(体表面から最も遠い側、正中側)に存在する網膜に投影される。網膜は更に網膜神経節細胞層、光受容細胞の層など、細胞の機能毎の層に分かれている。また網膜のすぐ外側を網膜色素上皮層が覆っている(図7)。

これらの組織は、眼という精密器官を機能させるために正しい配列で並んでいなくてはならない。例えば水晶体と網膜の形態や位置関係は非常に重要であり、発生過程でその形態形成のパターンが正確に制御されている。

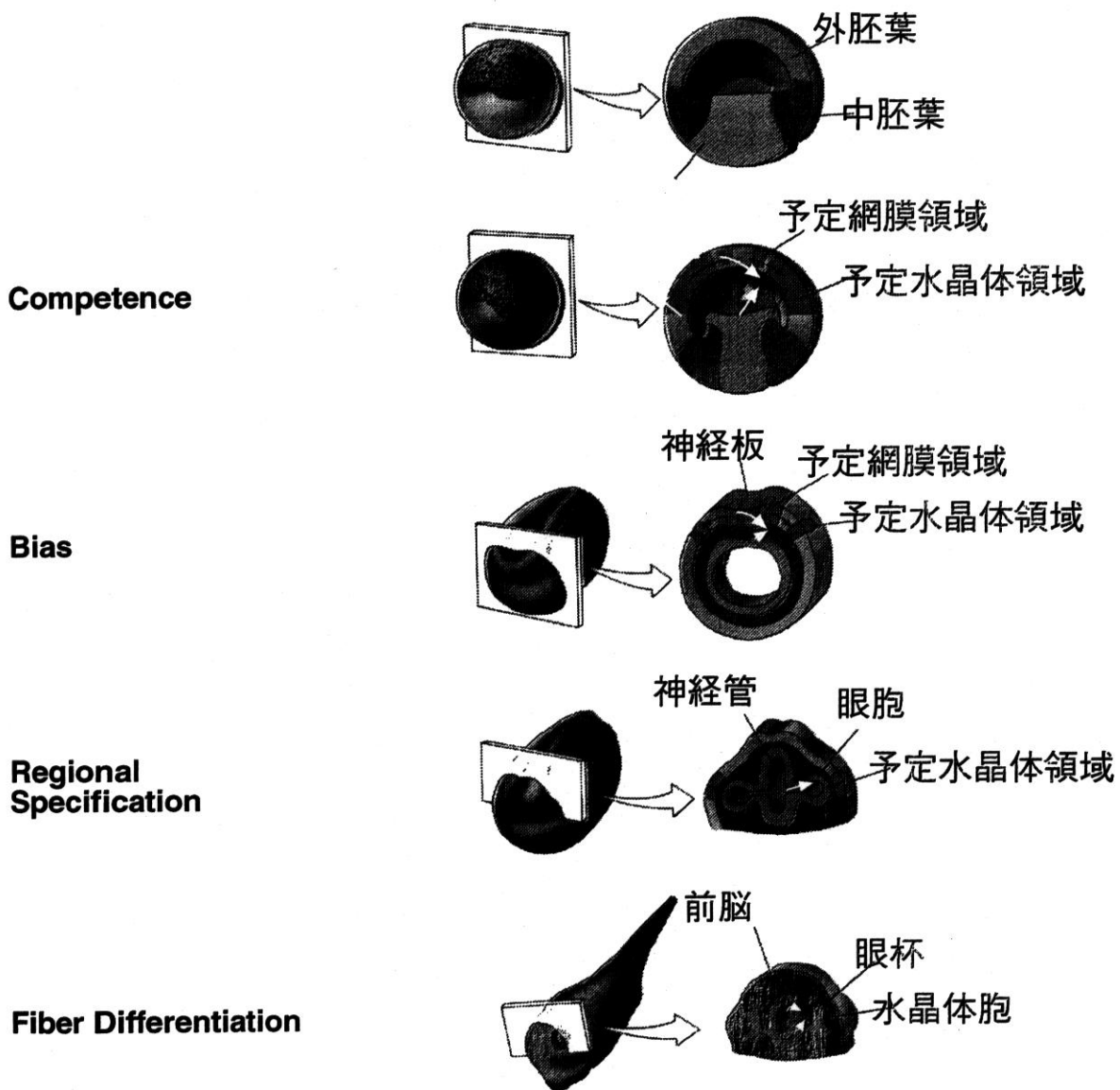


図6 水晶体分化のマルチステップモデル。水晶体分化における誘導は、眼胞による誘導によって表皮外胚葉が水晶体に分化するというinstructive inductionなメカニズムではない。水晶体の誘導は段階的に進む。外胚葉は中胚葉からの誘導や予定網膜領域からの側方誘導によってまず水晶体分化能を獲得し(competence or bias)、眼胞からの誘導によって、実際に水晶体に分化する細胞が決まる。(Grainger et al., 1992)

脊椎動物の眼

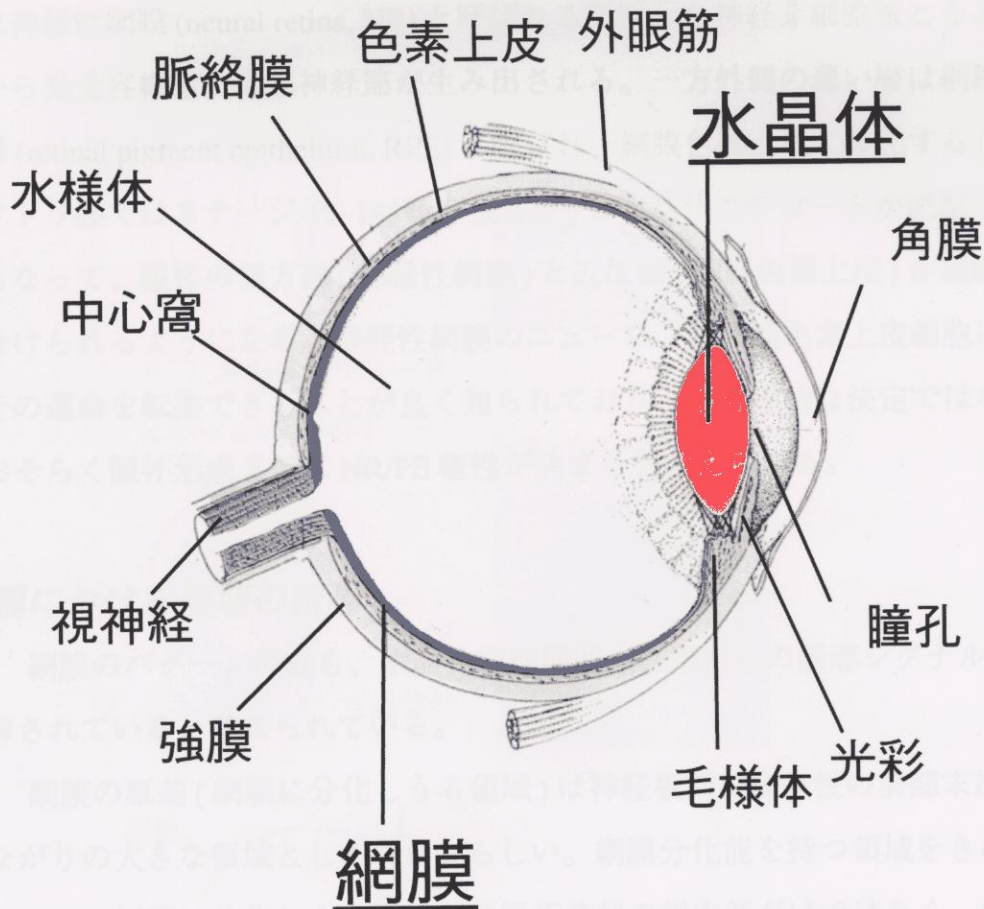


図 7 脊椎動物の眼の基本的な構造。図はヒト成人の眼を示す。ヒトは夜行性のマウスよりもむしろニワトリに近い構造を持つ。

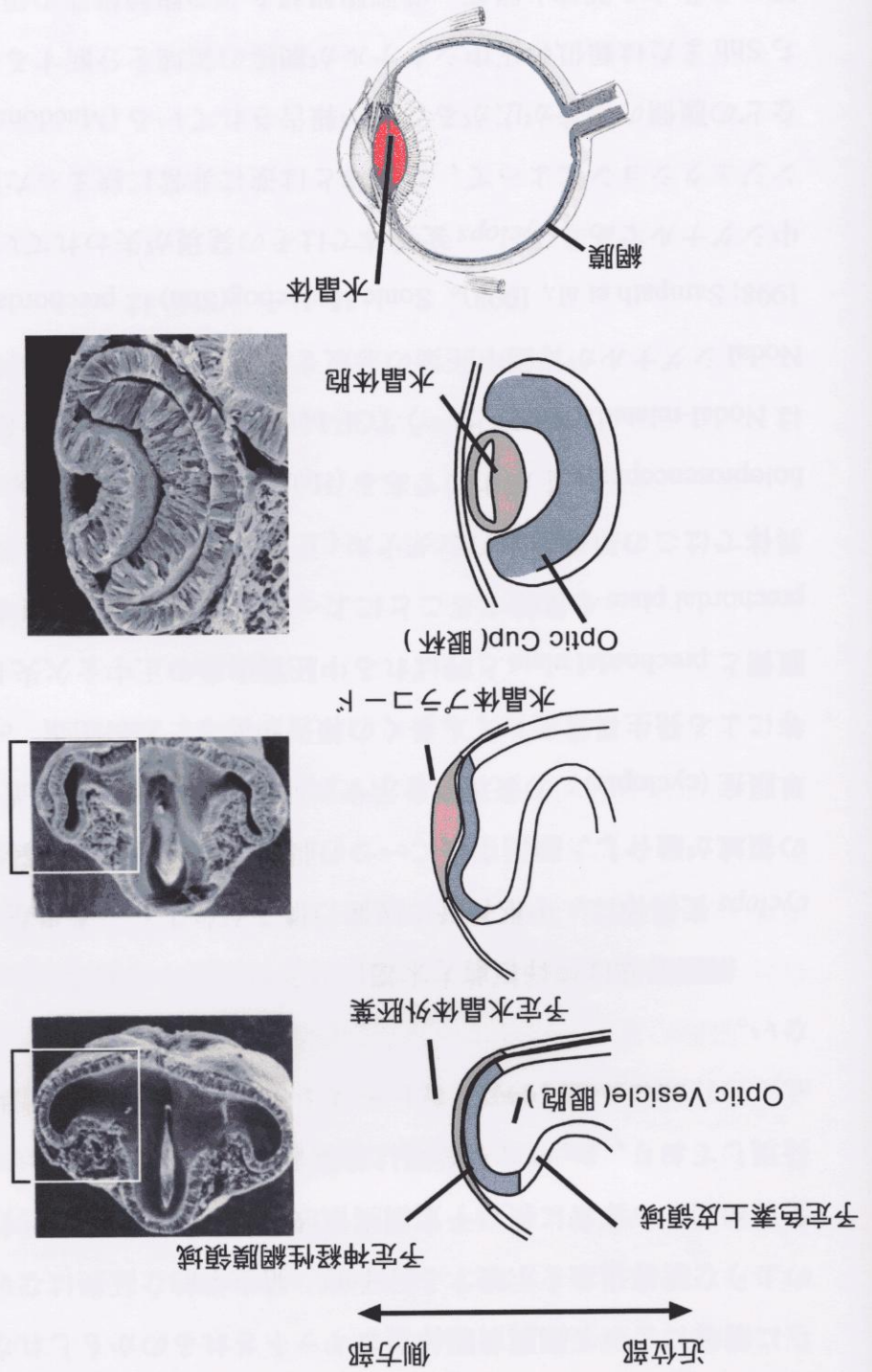
網膜の原基が形態的に明らかになってくるのは神経胚の時期で、このとき神経管の前端部腹側から一部伸展し眼胞と呼ばれる袋を形成する。この袋は将来視神経の通り道となる眼柄 (optic stalk) を介して脳胞とつながっている (図 8A)。眼胞はさらに眼胞をとりかこむ外胚葉 (これを表皮外胚葉と呼ぶのは語義の上で正しくないなので表面外胚葉と略す) に接した部分で陥入し、肥厚した内側の層と外側の層の内外二層の上皮からなる眼杯と呼ばれる構造を形づくる (図 8B)。内側の層は神経性網膜 (neural retina, NR) と呼ばれる肥厚した神経芽細胞層となる。この層から光受容細胞や網膜神経節が生み出される。一方外側の薄い層は網膜色素上皮層 (retinal pigment epithelium, RPE) と呼ばれ、網膜色素上皮に分化する (図 8C)。ニワトリ胚ではステージ 13~14 (孵卵後 2 日) に水晶体プラコードが肥厚するのにもなって、眼杯の側方部 (神経性網膜) と近位部 (網膜色素上皮) が組織学的に見分けられるようになる。神経性網膜のニューロンと網膜色素上皮細胞は分化後もその運命を転換できることが良く知られており、不可逆的な決定ではないもののおそらく眼杯形成までに NR/PE 極性が決まると考えられる。

網膜における初期の誘導

網膜のパターン形成も、水晶体同様周囲の組織からの誘導シグナルによって制御されていると考えられている。

網膜の原基 (網膜に分化しうる領域) は神経板期に神経板の前部末端にひとつつながりの大きな領域として現れるらしい。網膜分化能を持つ領域をきめる実験によって、網膜に分化しうる領域が神経板前部の側方部だけではなく、中央部 (すなわち予定前脳領域) にも存在することが示されている (Adelmanm, 1929)。初期の網膜のマーカである Rx/rax 遺伝子 (Casarosa et al., 1997; Mathers et al., 1997; Furukawa et al., 1997)、Pax6 (Walther and Gruss, 1991)、Tbx5 (ET) (Li et al., 1997, Takeuchi et al., 投稿中) などは神経板の前方に発現し、その発現は中央部にも存在しており、先の事実と良い一致を示す。眼を除く前脳予定域 (終脳から端脳にかけて) からも網膜が分化する結果が報告されていることを考えると (Boterenbrood, 1970; Corner, 1966)、網膜原基は最初から網膜として獲得されるというよりも、

図 8 眼の発生の模式図。青色は網膜とその予定域、赤は水晶体とその予定域を示す。



いったん広い領域に多分化能を持つ前脳原基として獲得され、更にはその中からさらに誘導によって網膜前駆体がコミットされるのかもしれない。現在のところそのような誘導現象を示唆する分子的、発生学的な証拠はないものの、Rxの発現は発現初期から非常に狭い予定網膜領域(実際に網膜に分化する領域)と前脳腹側で発現しており、Rxの強制発現は前脳領域に網膜を形成させることから(Casarosa et al., 1997; Sakagami, 1999)、むしろコミットされた領域に発現しているのかもしれない。

網膜原基は神経板前方末端にひとつながりの原基として生じる。Zebrafishの*cyclops*変異体は、中枢神経の腹側の構造が欠失し、本来左右に一对形成される眼の領域が融合し、顔面中央に一つの眼を持つという単一脳症(holoprosencephaly)、単眼症(cyclopia)、の表現形を示す。同様な症状はヒトの遺伝病として、化学物質等による発生異常としても多くの報告がある。Zebrafish *cyclops*変異体は前脳の腹側とprechordal plateと呼ばれる中胚葉由来の正中を欠失しており、野生型のprechordal plateを供給することによってその表現形は回復する。つまり*cyclops*変異体ではこの組織由来のシグナル(正中シグナル)を欠くことによってholoprosencephalyを示すのである(Hatta et al., 1994)。*cyclops*変異体の責任遺伝子はNodal-related2(Ndr2)というTGF-beta型のシグナル分子をコードしており、Nodalシグナルが背側中胚葉の形成を誘導すると考えられている(Rebagliati et al., 1998; Sampath et al., 1998)。Sonic Hedgehog(Shh)はprechordal plateで産生される正中シグナルであり*cyclops*変異体ではその発現が失われている。ShhのRNAのインジェクションによって、変異体とは逆に非常に狭まった眼の領域を持ち、眼柄などの腹側の構造が広がることが報告されている(Macdonald et al., 1995)。すなわちShhまたは類似の正中シグナルが網膜の領域を分断する事によって、実際に網膜に分化する領域と眼柄・前脳腹側部などの腹側構造の領域が決められると考えられている。

神経性網膜 - 網膜色素上皮極性の確立と維持

神経性網膜は眼杯の時期(ニワトリ胚の場合でステージ15)に既に網膜色素

上皮とは異なる運命をたどっていることが、形態的または遺伝子発現のレベルで明かである。網膜分化の指標遺伝子である Rx, 遺伝子は眼胞の内側(神経性網膜層)だけに限局して発現していることが報告されているが、眼胞から網膜色素上皮と神経性網膜がどのようにして分化するか、すなわち眼の遠近位軸(内外極性と書いてもよい)がいかんして確立されるか、という問題は眼の形態形成における重要な問題である。

眼胞の背側に存在する間充織細胞は網膜色素上皮の分化を誘導することが知られており、眼胞の腹側～側方にかけて表面外胚葉との接触がこの間充織の進入を防ぐために、結果的に網膜色素上皮の分化をおさえ、網膜の発生を正に制御しているという考えが示されている (Lopashov and Stroeva, 1961)。

一方水晶体が積極的に神経性網膜の分化を誘導する可能性が古くから示されてきた。例えば眼胞を外科的に取り出し、本来網膜色素上皮に分化する領域を体表面に近い側に来るように(すなわち眼胞の遠近位軸を逆転させるように)して戻したところ、ある発生段階までは体表面の水晶体外胚葉側から神経性網膜が分化することが1630年代に既に報告されている (Dragomirov, 1937; Mikami, 1939)。またニワトリを用いた実験で、ステージ10の眼胞が形成された直後の予定水晶体領域を取り除いたところ、わずかな神経性網膜の細胞を残してほとんどの細胞が網膜色素上皮に分化したという報告がされている (Hyer et al., 1998)。しかしながら、単純に予定水晶体外胚葉を除去した結果間充織細胞が予定神経性網膜領域に浸潤し、本来神経性網膜に分化する領域から神経性網膜が誘導されたという説明もでき、本当に水晶体を欠失したために神経性網膜が形成されなくなったかどうか定かではない。水晶体が網膜のパターン形成にどのように働いているかについては、より注意深い解析を必要としている。

網膜の分化に関わる既知のシグナル分子

いくつかの既知の細胞外シグナル分子が網膜の分化の誘導の実体であると考えられている。網膜の分化を誘導する因子に関する研究は数多くなされており、特に FGF(線維芽細胞成長因子)ファミリーに属する分子が神経性網膜の分化に影響

響することが知られている。bFGFは眼胞の組織培養条件下で眼胞から神経性網膜(網膜神経節)の分化を誘導することが報告されている(Pittack et al., 1997; Hyer et al., 1998)。眼胞の組織培養にbFGFを認識する阻害抗体を添加することで、網膜神経節の分化は抑制することができる。一方aFGFに関しては先に述べた予定水晶体外胚葉除去実験では、予定水晶体外胚葉除去の際にレトロウイルスに組み込んだFGF-1(aFGF)の遺伝子を感染させることによって、神経性網膜の分化が回復することが報告されている(Hyer et al., 1998)。

発生過程の眼でのFGFの発現は主にMcAvoyのグループによって、ラット胚を用いて詳細に観察されている(de Jongh and McAvoy, 1992; de Jongh and McAvoy, 1993; Lovicu and McAvoy, 1993; Lovicu et al., 1997)。aFGFは眼胞期(水晶体も肥厚していない)時期である受精後10日目胚(以下E10と略,ニワトリのステージ10~11に相当)の予定水晶体外胚葉で発現している。眼胞が陥入、肥厚して神経性網膜に分化するE11~E12(ニワトリのE2に相当)において、眼胞の側方、眼杯の内層(すなわち神経性網膜に分化する領域)にシグナルが見られる。また水晶体プラコード、水晶体胞のproximal側(つまり予定水晶体繊維細胞)で強く発現している。水晶体が分化し神経性網膜の肥厚がすすむE13以降(ニワトリのE3.5以降に相当)では網膜でのaFGFの発現は弱まり、相対的に水晶体とciliary marginでの発現が強まっている。それに対しbFGFは、E14に網膜神経節細胞の分化にともなって初めて発現が観察されている。ニワトリのFGFの発現パターンに関しては、E5(ステージ23)以降に関してbFGFの網膜での発現が報告されているが(Consigli, 1993)、初期の発現パターンはわかっていない。両者がそれぞれ独立な役割をもっているのか、重複した役割を担うのか不明であるが、発現パターンからはbFGFは網膜神経節の分化に関与しaFGFは網膜の初期のパターン形成に関わっているのではないかと予測される。

aFGF/bFGF以外のFGFが網膜とその前駆体で発現していることが報告されている。FGF-15はdifferential display法でクローニングされた新規のFGFであるが、マウスE9.5の非常に早い段階で眼胞の側方部(すなわち予定神経性網膜領域)で発現が確認されている(McWhirter et al., 1997)。また、FGF-12がラットE16の網

膜神経節領域で発現していることが報告されている (Hartung et al., 1997)。また Vogel-Höpker と筆者らの共同研究により FGF-8 が眼胞の腹側で (ニワトリ胚ステージ 12)、その後眼杯の中心部で (ステージ 15 頃) 発現していることが見いだされている (Vogel-Höpker et al., submitted)。FGF-8 は、その発現時期から眼胞の初期のパターニングに関与する因子の候補として挙げられている。

一方、FGF 受容体はおもなものとして FGFR-1 から FGFR-4 までの 4 種類存在し (Johnson and Williams, 1993)、そのうち FGFR-1、2、3 に関して発生過程の神経組織での発現が報告されている。FGFR-1, 2 は神経管に広く発現が見られるが、FGFR-1 はニワトリ E2.5 (おそらくステージ 15~16) の眼杯で弱く発現が見られるのに対し、FGFR-2 は眼の周囲を取り囲む間充織で発現する (Ohuchi et al., 1994; Tachibana, 1999)。FGFR-3 は眼胞側では発現していないが水晶体胞で強い発現が報告されている (Ohuchi et al., 1994; de Jongh et al., 1997; Wilke et al., 1997; Tachibana, 1999)。

網膜の NR-PE のパターンは比較的初期に確立されるものの、ある程度分化が進んだあとでも両者はその運命を入れ替えることができる。たとえば神経性網膜を除去すると、*in vivo* で分化した網膜色素上皮から神経性網膜が再生する (Coulombre and Coulombre, 1965; Lopashov and Stroeveva, 1964)。bFGF は神経性網膜の再生を誘導できることが報告されている (Park and Hollenberg, 1989; Park and Hollenberg, 1991)。この分化転換は培養条件で自発的にも起こりうるが、aFGF/bFGF を培地中に添加することで分化転換を誘導することができる (Pittack et al., 1991; Guillemot and Cepko, 1992)。ウズラの *silver* 変異体は色素上皮細胞が自発的に神経性網膜に分化転換する表現形を示し、aFGF に過敏に応答して *in vitro* で分化転換する。*silver* 変異体では網膜色素上皮に分化した細胞がその性質を維持するのに必要な機構が欠損しているのではないかと考えられている。FGF が初期のパターン確立に働いているのか、それとも神経性網膜の網膜神経節への分化の制御やその後の性質の維持に働いていると考えるとつじつまが合う。

***Sgx-1* の同定とその特異的な発現**

眼における誘導のメカニズムを解析するにあたって、本研究では網膜と水晶体の両者に着目し、網膜と水晶体の原基が互いに、または周囲の組織によってどのように誘導を受けているのか明らかにしようと試みた。その際に、誘導シグナルの発現や効果を調べるのではなく、誘導の過程で発現する転写因子に注目し、その発現がどのように制御されているのか、またそれらの強制発現によって、眼の発生や他の遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすことができるのかを調べることで、眼の誘導の過程を明らかにする。

本研究の過程で、眼 cDNA ライブラリからクローニングされた遺伝子 *Sgx-1/SHo-1* および *Sgx-2* は、水晶体プラコード、眼杯の陥入に伴って発現するという意味でこれまで知られている眼で発現する転写因子群と一線を画し、水晶体や網膜の誘導に深く関わっているのではないかと予測される。そこで、*Sgx-1* タンパク質の眼での役割を調べることで、眼における誘導のカスケードを解明することにした。

材料と方法

Sgx-1 遺伝子のクローニング

ニワトリ E4 の水晶体、網膜から RNA を単離し、cDNA ライブラリを作製した (Kakizuka et al., 1993)。スクリーニングはオリゴヌクレオチドを用いた標準的な方法によって行った (Sambrook et al., 1989)。プローブとして NK 型のホメオドメインの 3 番目のヘリックスに対応するオリゴヌクレオチド (^{32}P -GARACICARGTIAARATHHTGG または ^{32}P -GTGAAGATTTGGTTCCAGAACCGC) を用いた。得られた cDNA クローン中の一つ、Hx4 はホメオドメインを含む cds をカバーしており、このクローンを *Sgx-1* とした。得られた 20 個のクローンの約半数は *Sgx-1* の部分クローンであり、残りの半数は *Sgx-2* 名付けた新規のホメオボックス遺伝子の cDNA であった。

ニワトリ胚の操作

ニワトリ種卵は竹内孵卵場 (奈良県) から購入した白色レグホン種をもちいた。寝かせた状態で、湿度を補った 38.5°C の孵卵器中で発生させた。孵卵後、鋭い法の端にはさみで直径 1 mm 程度の穴を開け、シリンジを用いて 3~4 ml の卵白を吸引したあと、セロハンテープで穴を塞いだ。卵殻の上方に眼科用剪刀で窓を開けた。Hamburger-Hamilton のステージ表 (Hamburger, 1951) に従ってステージを決定した。

予定水晶体外胚葉除去

予定水晶体外胚葉除去手術は、ステージ 11~12 の胚に対して行った。Hank's 緩衝液 (10 mM HEPES-Na (pH. 7.5), 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.0 g/L glucose, 0.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2) を 2、3 滴垂らし、ビテリン膜をタングステン針で裂いて穴を開けた。ステージ 12 では前脳領域までが羊膜で覆われているが、羊膜を破らないように引き出して頭部を露出させた。ガラスニードルで 1% Nile Blue (ナカライテスク) 水溶液を予定水晶体外胚葉周辺に注入し、5 秒~10 秒程度静置して染

色した後、十分量(1 ml 前後)の Hank's 緩衝液で過剰の Nile Blue を洗い流した。染色された外胚葉をタングステン針で剥がした。外胚葉の水晶体分化能は前脳腹側に位置する外胚葉にも強く見られるので、前脳~眼胞の腹側部を取り囲む表面外胚葉を除去した。操作後、羊膜を再び被せ、窓をセロハンテープで封印して孵卵器に戻し、発生を進行させた。

エレクトロポレーション

エレクトロポレーションの基本的な方法は第一部で述べた。Sgx-1 の胚表面の外胚葉での強制発現の場合 Sgx-1 の発現ベクター pCAGGS-Sgx-1 を $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で用いた。pCAGGS-GFP($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) または pCAGGS-LacZ($0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を導入細胞のトレーサーとして用いた。トレーサーによる検出感度が FLAG 抗体染色に比べ非常に高いことから、Sgx-1 遺伝子とトレーサー遺伝子の濃度比を、Sgx-1 に連結した FLAG エピトープに対する抗体染色のパターンと、トレーサーのパターンが同一になるように決めた。対照としては pCAGGS-Sgx-1 の代わりに同濃度の pCAGGS を導入した。DNA 溶液を予定水晶体外胚葉周辺に注入し、タングステン針を胚の前方から挿入し、胚のすぐ脇に置き、10 V 50 msec のパルスをも3回負荷した。

眼胞へのドミナントネガティブ Sgx-1(pCAGGS-FLVP-S1) の導入には、眼杯に対するエレクトロポレーション法を用いた(前章参照のこと)。DNA 濃度は表皮の場合と同じ濃度に設定した。ステージ 10~11 のニワトリ胚の前部神経孔からガラスニードルを挿入し、DNA を眼胞内部に注入した。微小電極を前部神経孔から挿入し、先端が眼胞内部に到達した状態で 5~7 V, 25 msec のパルスをも2回負荷した。

プラスミド

pEFX3

基本となるベクター pEFX3(Ogino and Yasuda, 1998b) は EF-1 α のプロモーターを持つ真核生物細胞用の発現ベクターである。このベクターの詳細は付録を

参照のこと。

● pEFX3-FLAG/pEFX3-FL2

pEFX3 の HindIII サイトに FLAG エピトープをコードするオリゴヌクレオチドを挿入した FLAG タグ融合タンパク用の発現ベクターである (付録を参照)。

● pEFX3-FL-Sgx1

pEFX3-FLAG の EcoRV/BamHI サイト Sgx-1 遺伝子のタンパク質コード領域 (CDS) を挿入したもので、FLAG エピトープタグを Sgx-1 タンパクの N-末端に連結した融合タンパクを産生する (付録を参照)。

● pEFX3-GAL4

GAL4 融合タンパク用の発現ベクターである。pEFX3 の HindIII/Asp718 サイトに、pCMX-GAL4 から HindIII-Asp718 で切り出した、大腸菌の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 (Sadowski and Ptashne, 1989) をコードする配列を挿入した。この GAL4 DNA 結合領域は pSG424 に由来する (付録を参照)。

● pEFX3-GAL4-S1

pEFX3-GAL4 の EcoRV/BamHI サイトに Sgx-1 遺伝子のタンパク質コード領域 (CDS) を挿入したもので、GAL4 の DNA 結合領域を Sgx-1 タンパクの N-末端に連結した融合タンパクを産生する (付録を参照)。

● pEFX3-FLVP

VP-16 AD 融合タンパク用の発現ベクター。pEFX3-FL2 の HindIII サイトに pCMX-VP16(new) から HindIII で切り出したフラグメント (VP16 の 78 アミノ酸からなる転写活性化ドメインをコードする) (Sadowski et al., 1988) を挿入した (付録を参照)。

● pEFX3-FLVPS1

pEFX3-VP16 の EcoRV/BamHI サイトに Sgx-1 遺伝子のタンパク質コード領域 (CDS) を挿入したもので、FLAG-VP16AD-Sgx-1 の順に連結した融合タンパクを産生する (付録を参照)。

● pCAGGS-Sgx-1

pCAGGS は Niwa らによって構築された CAG キメラプロモーターをもつ強力

な発現ベクターである (Niwa et al., 1991)。pEFX3-Sgx-1 を EcoRI/BamHI で処理しクローニングサイト、FLAG-Sgx-1 を含むフラグメントを切り出し、pCAGGS の EcoRI/BglII サイトに導入した (付録を参照)。

● pCAGGS-FLVP-S1

pEFX3-Sgx-1 を EcoRI/BamHI で処理しクローニングサイト、FLAG-VP16-Sgx-1 を含むフラグメントを切り出し、pCAGGS の EcoRI/BglII サイトに導入した。(付録を参照)

● TK-MH100x4-LUC

ホタル由来 luciferase 遺伝子に tk プロモーター、GAL4 タンパク質の結合配列 MH100(Kang et al., 1993) を 4 コピー繋いだレポーター遺伝子。Barry Forman によって作製された。

MH100: agct-cga-CGGAGTACTGTCCTCCG-tcg-aagct

In situ ハイブリダイゼーションとプローブ

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの方法は Henrique らの方法に従った (Henrique et al., 1995)。ホールマウント *in situ* を行ったのち、胚をパラフィンで包埋し、20 μ m の切片を作製した。切片 *in situ* ハイブリダイゼーションは田村らの方法に従った (私信)。いずれも RNase を用いない改良型の *in situ* 法である。詳細は付録参照のこと。Rx に対するプローブは、clone6B (Sakagami, 1999) を BamHI によって切断後 T3 RNA ポリメラーゼを用いて転写したものをを用いた。Sgx-1 は SK(-)-Sgx-1(clone Hx4) を HindIII で消化後、T3 RNA ポリメラーゼで転写した。L-maf は clone 4F1-7 を Asp718 で切断後 T3 RNA ポリメラーゼで転写したものと clone 9F1-6 を XbaI で切断後 T7 RNA ポリメラーゼで消化後を混合して (終濃度 1 μ g/ml) 用いた (Ogino and Yasuda, 1998b)。Tbx5 はクローン cTbx5-3 を XbaI で切断後 T3 RNA ポリメラーゼで転写した (Ohuchi et al., 1998)。Pax2 は Clone E1B(仲村春和先生より分与) を EcoRV で切断後 T3 RNA ポリメラーゼで転写した。

神経性網膜細胞の初代培養とレポーターアッセイ

ニワトリ E8 の眼球を摘出し、CMF 中で眼球から神経性網膜を取り出した。光彩剪刀で小さく切った後、0.25% トリプシン /CMF で 37°C 11 分間処理した。初代培養用の培養液 (DMEM, 10%FBS, 1% Chicken Serum) で反応をとめ、遠心してトリプシンを除いた後、10 cmφ ディッシュあたり 10^6 個の濃度になるよう希釈して播種した。ある程度細胞が増殖し、コンフルエントに近い状態になったところで次のようにして 24 穴プレートに移した。CMF で細胞を洗った後 0.1% トリプシン /CMF で 5 分間処理して細胞を剥がした。培養液で反応を止め、遠心してトリプシンを除いた後 30% コンフルエントになるように希釈して 24 穴プレートに播種した。1 ウェルあたりの培養液の量は 0.5 ml。サブコンフルエント (コンフルエントに対し細胞の面積が 50%) に増殖した時点でトランスフェクションを行った。リン酸カルシウムの沈殿を加える 2 時間前後前に培養液を交換した。2x BES (50 mM BES (pH 6.95), 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4) を 100 μl ずつエッペンドルフチューブに分注した。CaCl₂/TE バッファー (1.0 mM Tris-HCl (pH. 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.25 M CaCl₂) 100 μl に DNA を 3.2 μg (内訳: レポーター 1.0 μg , pEFX- β -gal 0.6 μg , エフェクター (Sgx-1 等の発現ベクターと空の発現ベクター 0.8 μg , pEFX-GFP 0.8 μg) 加えたものを、先のチューブに強く振盪しながらゆっくり加え、リン酸カルシウム沈殿の懸濁液とした。20 分後、懸濁液を 1 穴あたり 50 μl ずつ (培養液の 1/10 量) 滴下し、よく混ぜた。6 時間後に Hank's バッファーで 2 度洗浄した。懸濁液を添加してから 24 時間後に細胞を Hank's バッファーで洗い、Lysis バッファー (25 mM Tris-PO₄ (pH. 7.8), 15% glycerol, 2% CHAPS, 1% lecithin, BSA (fraction V) 0.1%, 4 mM EGTA, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.4 mM pAPMSF) を 100 μl 加えて細胞からタンパク質を抽出した (細胞溶解液)。トランスフェクション効率は各ウェルに等量加えた b-galactosidase 活性を測定することで平均化した。Gal 反応バッファー (1 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 0.33% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.33 g/L ONPG) 100 μl に対し 20 μl の細胞溶解液を加え、37°C で 30 分反応してから 50 μl の 0.1 M Na_2CO_3 を加えて反応を止めた。420 nm の吸収を測定して相対 β -galactosidase 活性とした。レポーター転写量はルシフェラーゼ活性を酵素化学的に測定することで求めた。ML3000 (DYNEX Laboratory) を使用して 50

μl の細胞溶解液に 100 μl のルシフェラーゼアッセイ試薬 (20 mM Tricine-Na(pH.7.8), 3.74 mM magnesium basic, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 μM coenzyme-A, 470 μM luciferin, 530 μM ATP) を添加し、直後の化学発光を 10 秒間測定した。レポーター遺伝子の転写活性はルシフェラーゼ活性の絶対値ををトランスフェクション効率からノーマライズしてもとめた。

抗体染色

抗体は次のような条件で用いた。抗 FLAG 抗体 M2 (Kodak または SIGMA より入手) は 10% 仔ヒツジ血清 /PBST などのブロッキング液で約 5μg/ml の濃度に希釈して用いた。抗 δ-crystallin はモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (Sawada et al., 1993) の培養上清をそのままもちいた。ウズラ細胞の核を認識する抗体 QCPN (Selleck and Bronner-Fraser, 1995; Kontges and Lumsden, 1996) はハイブリドーマの培養上清を用いた。二次抗体は HRP 標識 anti-mouse IgG P0161 (DAKO) を 1/100 倍希釈、または Texas-Red 標識 anti-mouse IgG (Amarsham) を 1/40 倍希釈して用いた。

結果

Sgx-1 の構造と転写抑制因子としての機能

Sgx-1/SOHO-1 (Deitcher et al., 1994) と *Sgx-2* は、NK 型ホメオボックスの 3 番目のアルファ-ヘリックスに対応するオリゴヌクレオチドプローブをもちいて、ニワトリ胚の眼 cDNA ライブラリからクローニングされた遺伝子であり、ホメオドメインを持つ転写因子をコードしている。*Sgx-1* のホメオドメインはニワトリ *Sgx-2*、マウス、ニワトリ *Nkx5.1/Nkx5.2* (Bober et al., 1994; Brandt-Rinkwitz et al., 1995; Herbrand et al., 1998), ウニの *TgHbox5* (Wang et al., 1990), *c. elegans* 遺伝子座 C39E6.3 の候補タンパク質など、いくつかの既知のホメオドメインとほとんど同一であった (図 9A)。特にホメオドメインの 4 つのアルファ-ヘリックスのうち DNA との相互作用に関わる 3 番目のヘリックス領域は完全に一致しており、これらのホメオドメインが共通の標的配列を認識することを示唆する。それ以外では *NK2*, *NK4*, *Nkx2.1*, *TTF-1* などの NK クラスホメオドメインと類縁度が高いが、明らかに別のクラスを構成していると考えられる。これらのホメオドメインタンパク質のホメオドメイン外の領域についてアミノ酸配列を比較したところ、その多くはホメオドメインの 3' 側に保存されたアミノ酸配列 (SC 領域) をもっていた (図 9B)。これらのホメオドメインタンパク質が類似した DNA 結合配列や機能を持ち、サブファミリー (*Sgx* ファミリー) を構成していることを示唆する。SC 領域の機能に関しては今まで報告がないが、他の転写制御因子との相互作用に関わると予想されている。

ホメオドメインと SC ドメイン以外には *Sgx-1* と *Sgx-2* の間、または *Sgx-1* と他の *Sgx* ファミリーのメンバーの間に高い相同性は見られなかった。ただし、*Sgx-1* はホメオドメインの上流に *engrailed*, *gsc*, *NK2*, *msh* などに共通して存在する数アミノ酸の配列 (Smith and Jaynes, 1996) をもっていた (図 9C)。この配列は *Sgx-2* には存在しないが、*Sgx* ファミリーである *Nkx5.1* にも弱いながら類似性が見られた。*engrailed* の場合、この領域は積極的な転写抑制に関与する *eh-1* ドメインに含まれている。本来転写活性化因子である *ftz* タンパクにこのドメインを連結させる

A

cSgx-1	KKKTRTIFSK	SQVFQLESTF	DVKRYLSSAE	RAGLAAALHL	TETQVKIWFQ	NRRNKLKRQL
cSgx-2	KKKTRTVFSR	SQVFQLESTF	DVKRYLSSSE	RAGLAASLHL	TETQVKIWFQ	NRRNKWKRHV
cNkx5.1	KKKTRTVFSR	SQVFQLESTF	DMKRYLSSSE	RAGLAASLHL	TETQVKIWFQ	NRRNKWKRQL
mNkx-5.2	KKKTRTVFSR	SQVYQLESTF	DMKRYLSSSE	RACLASSLQL	TETQVKIWFQ	NRRNKWKRQL
TgHbox 5	KKKTRTVFSR	SQVFQLESTF	EVKRYLSSSE	RAGLAANLHL	TETQVKIWFQ	NRRNKWKRQM
C39E6.3	KKKTRTVFSR	SQVSQLEMMF	ECKRYLSSQE	RSNLAQKLHL	TETQVKIWFQ	NRRNKFKRQA

Consensus KKKTRTVFSR SQVFQLESTF DVKRYLSSSE RAGLAA.LHL TETQVKIWFQ NRRNKWKRQ.

B

3' end of homeodomain

cSgx-2	AAELEAANLS	HAA	QRIVRVP	ILYHENSIP	
cNkx5.1	AAELEAANLS	HAA	AQRIVRVP	ILYHENSIG	
mNkx-5.2	SAELEAANMA	HAS	AQTLVGMP	-LVFRDSS	
TgHbox 5	AAELEAANLA	HAAQIRAQAN	LAQASAAHAH	AHAQRMVRVP	ILYHENSIS

Consensus AAELEAANLS HAA

AQRIVRVP ILYHENSIS

C

chicken Sgx-1	APPSAFSIDSILQFGPRCQAREQ
Drosophila en	KPSLAFSISNILSDRFGDVQKPG
mouse En-1	HRTTNFFIDNILSPDFGCKKEQP
Human En-2	HRITNFYIDNILRPEFGRRKDAG
Xenopus gsc	MPSGMFSIDNIIAARPRCKESVL

consensus FSIDNILS

図9 Sgx 遺伝子に特徴的な配列の比較。A)Sgx-1 は他の Sgx ファミリーのメンバーとほとんど同一のホメオドメインを持つ。B)Sgx ファミリーの多くはその 3' に隣接して 28 ないし 29 アミノ酸の保存された配列を持つ。C) Sgx-1 は en の転写抑制ドメインに保存された配列を持っていた。(Smith and Jaynes, 1996)

ことで転写抑制能を付与できることが報告されている (Smith and Jaynes, 1996)。

Sgx-1 の水晶体プラコード、眼胞での発現解析

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により、ステージ 11~13 の胚での Sgx-1 の発現を調べた。ステージ 11 には、眼での Sgx-1 の発現は全く確認できなかった (図 10A)。同一の胚の耳プラコード (この時期にはある程度陥入を始めている) では強い発現が確認できることから、Sgx-1 はステージ 11 には眼で発現していないことが確かめられる。ステージ 12 (孵卵後約 42 時間) の胚の眼では Sgx-1 のシグナルがわずかに確認できた (図 10B)。この時期には Sgx-1 の発現は背腹軸 (DV 軸)、鼻-耳軸 (NT 軸) 方向に偏りは見られなかった。切片を作成して調べると、Sgx-1 は眼胞と予定水晶体外胚葉 (将来水晶体プラコードを形成する領域) で発現していた (図 11A)。眼胞での発現は将来神経性網膜を形成する眼胞側方部にみられた。水晶体と眼胞での発現領域は互いに隣接した関係にある。ステージ 13 に達すると、水晶体プラコードは肥厚をはじめ眼胞も側方から陥入する。この時期には Sgx-1 の眼胞での発現は多少鼻側への限局を示した (図 10C)。切片を作成して観察したところ背腹軸方向に発現が広がり、陥入している眼杯の領域よりも多少広い領域で Sgx-1 の発現が見られた (図 11B)。水晶体、網膜の前駆体での発現はその後も続き、ステージ 15 では水晶体胞と眼杯の鼻側で強く発現していた。特に眼杯の背側の縁部で強いシグナルが観察された (図 10D)。切片を作成して調べると Sgx-1 は眼杯内層だけではなく、眼杯外層にも強く発現していた。内層の中心部ではむしろ発現は弱く、眼杯背側の「杯の縁」で強いという特徴を持つ (図 11C)。網膜特的に発現することが知られる Rx の発現 (図 15E) と比較すると、Sgx-1 の発現は細胞の分化の運命とは必ずしも一致しないことが示される。Rx は眼胞の側方部で発現するという点で似ているが、ステージ 15~18 には眼胞の内層に限局して発現しており、眼杯の外層には全く発現が見られなかった。また、眼杯の内層でも、周辺部、すなわち毛様体 (ciliary margin) 領域では発現が弱い (Sakagami, 1999)。水晶体胞に関しても同様で、水晶体特異的に発現する転写因子 L-maf は水晶体胞でのみ発現しその周囲では全く発現していなかったのに対

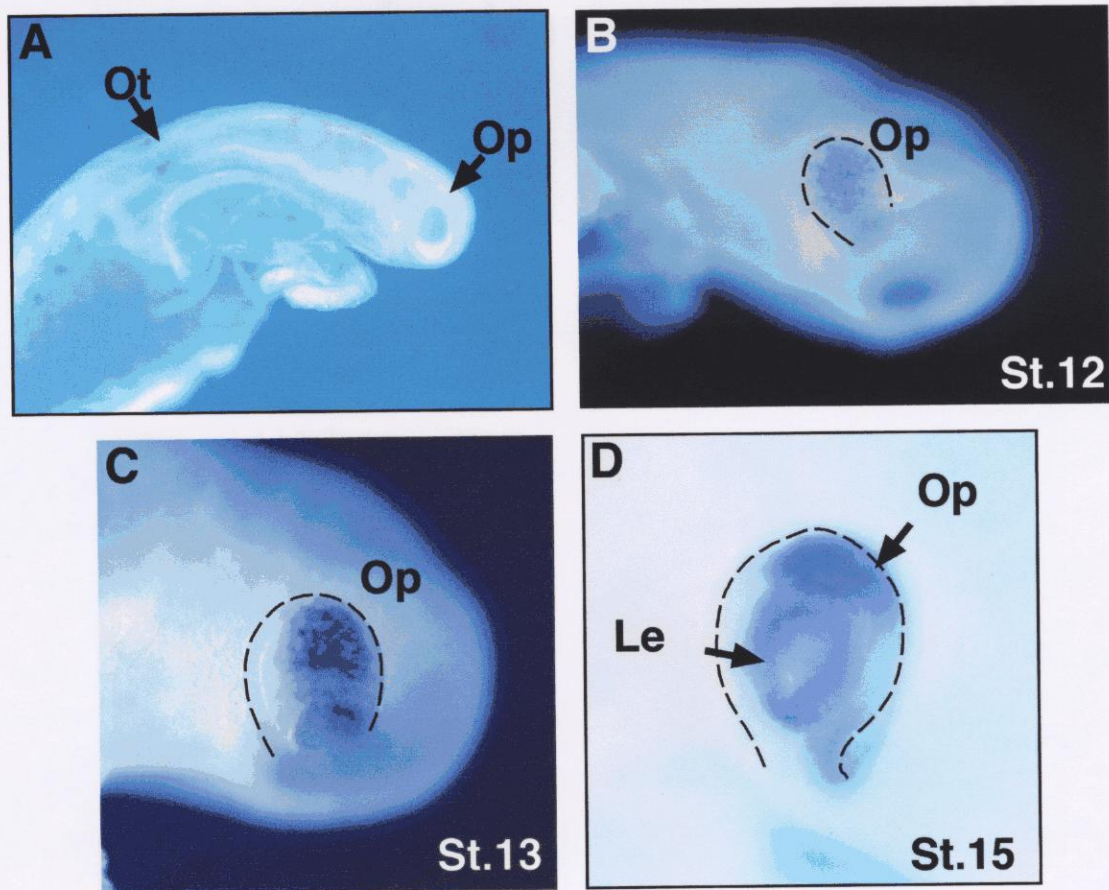


図 10 ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた、眼における Sgx-1 の初期の発現。A) ステージ 11: 陥入を始めた耳胞では Sgx-1 の発現が同定できたが、眼では発現していない。B) ステージ 12: 陥入直前の眼 (眼胞) において初めて発現が観察される。点線は眼胞を示す。発現は眼胞の拡がりとはほぼ一致している。C) ステージ 13: 眼胞での発現がより強くなり、鼻側に片寄る。D) ステージ 15: 陥入した水晶体胞、眼杯で強い発現が見られる。眼杯での発現は特に背側の縁で強い。また発現は背腹軸方向に沿って観察されるが、眼杯のこめかみ側では発現していない。
 Ot: 耳胞 Op: 眼胞または眼杯 Le: 水晶体胞

図 10 ステージ 13: 陥入を始めた眼杯
 図 10 ステージ 15: 眼杯の背側の縁で強く
 発現する。また発現は背腹軸方向に沿って
 観察されるが、眼杯のこめかみ側では
 発現していない。Op: 眼胞 / 眼杯、Le: 水晶体
 プラコード / 水晶体胞。

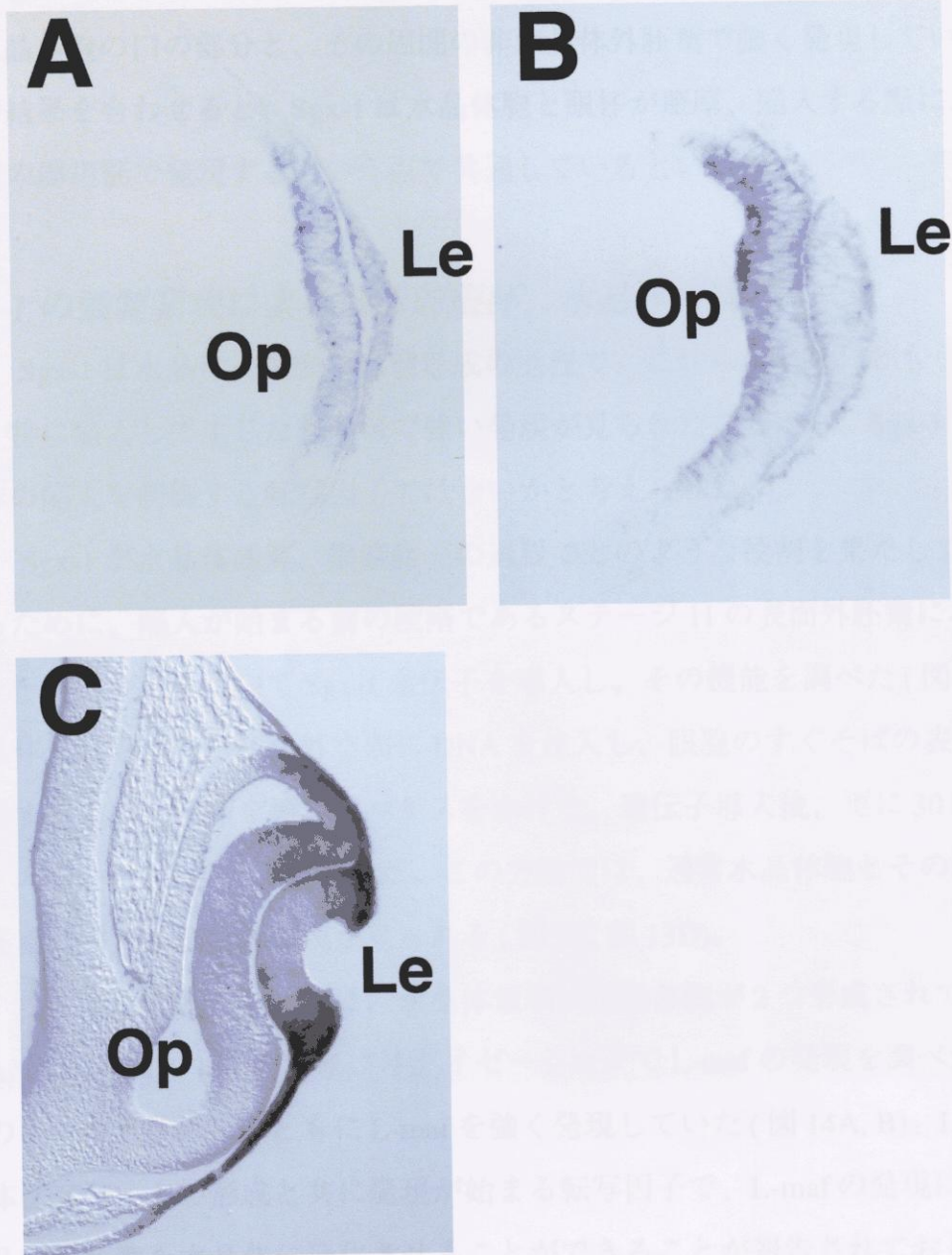


図 11 眼胞と水晶体プラコードでの Sgx-1 の発現。いずれも右が側方、左が正中側、上が背側、下が腹側 A) ステージ 12(発現開始直後)主に眼胞の水晶体と接した領域、予定水晶体外胚葉にシグナルが見られる。B) ステージ 13: 陥入を始めた眼杯と水晶体プラコードにシグナルが見られる。C) ステージ 15: 眼杯の背側の縁で強く発現する。発現は内層と外層の両方に見られるが、主に内層で強い。水晶体胞の表皮外胚葉との接合部、すなわち予定水晶体上皮領域でも強い発現が見られる。陥入する領域の縁で強い点で共通する。Op: 眼胞 / 眼杯、Le: 水晶体プラコード / 水晶体胞。

し (Ogino and Yasuda, 1998b)、Sgx-1 は水晶体胞全体で発現するのではなく、袋状の水晶体胞の口の部分と、その周囲の非水晶体外胚葉で強く発現していた。これらの結果を合わせると、Sgx-1 は水晶体胞と眼杯が肥厚、陥入する際に、陥入する領域の周辺部で発現するという点で共通しているといえる。

Sgx-1 の強制発現による異所的眼杯、水晶体の誘導

Sgx-1 は水晶体、網膜の形態形成の過程で、これらの肥厚にともなって発現し、特に陥入して生じた胞の縁で強い発現が見られたことから、Sgx-1 が眼胞や水晶体の陥入を制御する転写因子ではないかと考えられた。

Sgx-1 が水晶体誘導、網膜誘導の過程でどのような役割を果たしているか調べるために、陥入が始まる前の段階であるステージ 11 の表面外胚葉にエレクトロポレーション法を用いて Sgx-1 遺伝子を導入し、その機能を調べた (図 3A)。予定水晶体外胚葉周辺の胚体外空間に DNA を注入し、眼胞のすぐそばの表面外胚葉に隣接するように電極を挿入しパルスをかけた。遺伝子導入後、更に 30 時間孵卵させ、ステージ 17 前後で観察した。この方法では、通常水晶体胞とその周囲の表皮外胚葉に導入遺伝子の発現が見られる (図 3B, 図 13D)。

Sgx-1 を導入した胚では、水晶体領域に水晶体胞が 2 つ形成されていた (図 12A, D, 図 13A)。in situ ハイブリダイゼーションで L-maf の発現を調べたところ、この 2 つの水晶体胞はともに L-maf を強く発現していた (図 14A, B)。L-maf は水晶体プラコードの形成と共に発現が始まる転写因子で、L-maf の発現によって非水晶体外胚葉を水晶体に分化させることができることが報告されており、水晶体分化を決定づける因子と考えられる。Sgx-1 によって誘導された水晶体胞は水晶体に分化していることが確かめられる。異所的な水晶体は扁平な胞状で、一次水晶体繊維を形成する内側の領域と表面外胚葉と接する水晶体上皮細胞に分かれていた。正常水晶体と形態的な特徴はほとんど同じであり (図 13A, C)。場合によっては二つの水晶体は全く見分けがつかなかった。

水晶体が 2 つ形成されているだけでなく、眼胞の側方部から 2 カ所で陥入が生じ、重複した眼杯を形成していた (図 12A, D, 図 13A, C)。眼杯の内層はどちら

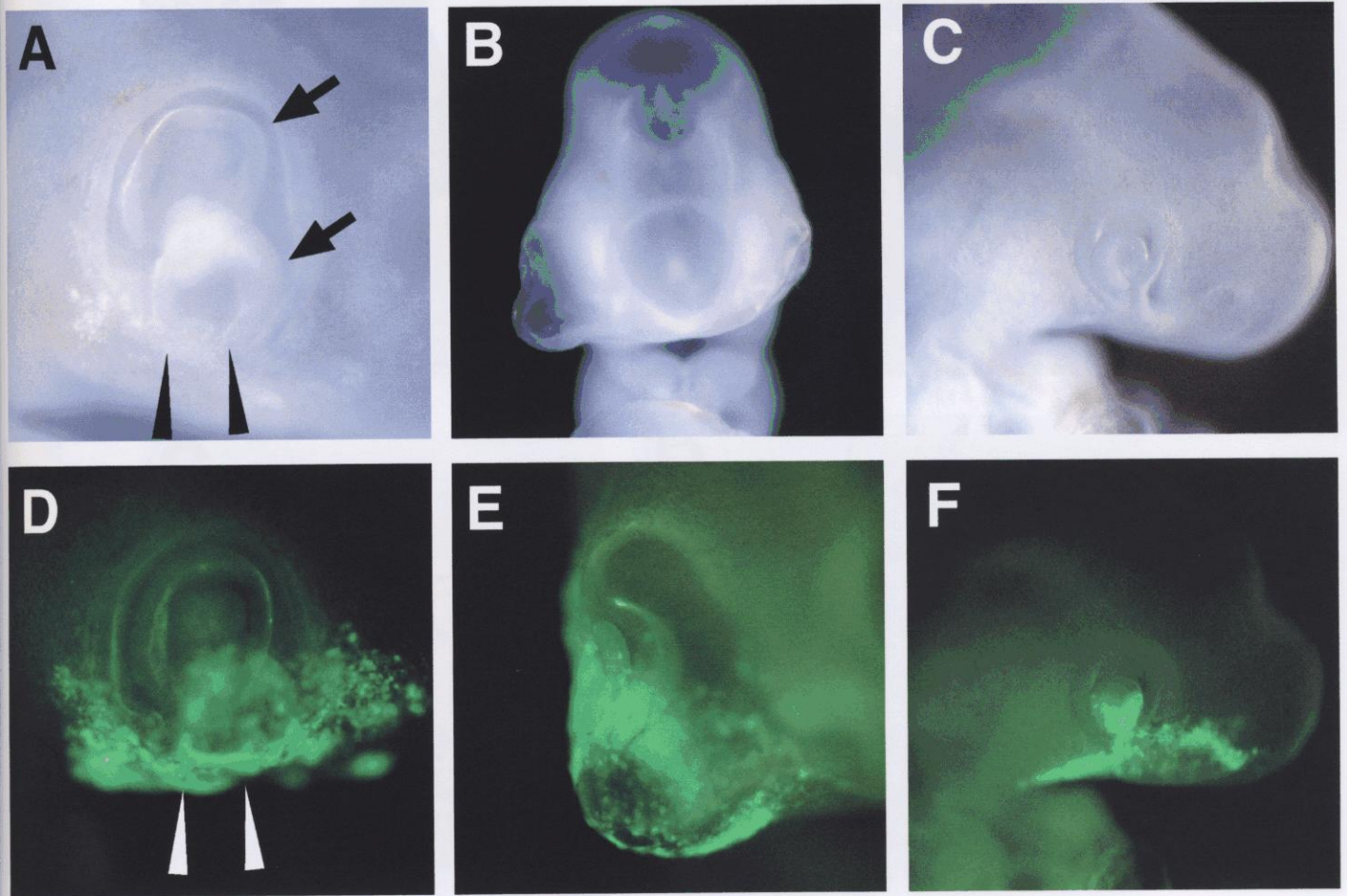


図 12 Sgx-1 を表面外胚葉で異所的に発現した場合の眼杯、水晶体の重複。A)~C) 明視野像、D)~F) 共導入した GFP のパターン。GFP と Sgx-1 とほぼ一致した発現パターンを示す条件で導入されている。A, D) Sgx-1 を導入した胚では眼杯の重複が観察される。この標本では Sgx-1 は眼胞の腹側部に導入されており、その領域を中心に異所的な眼杯の陥入が見られる。矢印は眼杯、矢尻は Sgx-1 を導入した領域を示す。B, E) 場合によっては眼杯が陥入する代わりに全体が側方へ突出する。この胚では眼胞と接した表皮外胚葉の広い領域に導入遺伝子の発現が見られる。C, F) 対照、エレクトロポレーションそのものは胚発生に影響しない。Sgx-1 の発現プラスミドの代わりに、何も挿入していないベクターを用いている。

図 13 導入遺伝子の周縁に眼杯が陥入する。A) B) エレクトロポレーションで遺伝子を取り込んだ細胞を、共導入した lacZ レポーター遺伝子によって可視化した。A) Sgx-1 を導入した場合、Sgx-1 を導入した細胞の周縁に眼杯が陥入している。眼杯そのものと水晶体層では導入遺伝子の発現が見られない。陥入した眼杯は両者共に肥厚し、神経性網膜に特異化しつつあることを示す。B) 対照胚、正常な眼の形態を呈する。水晶体に導入遺伝子の発現が見られ、水晶体そのものがエレクトロポ

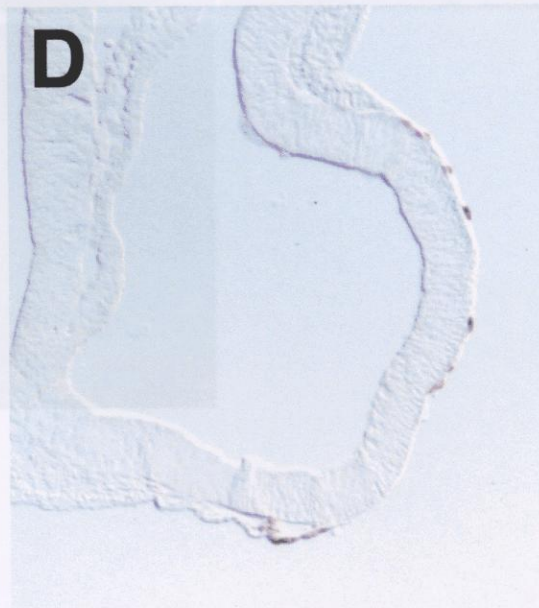
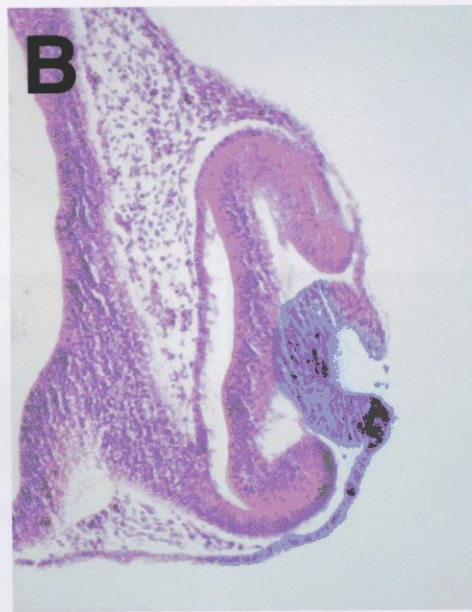
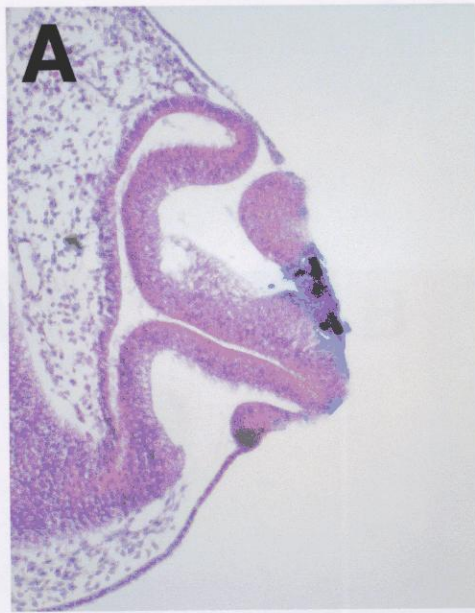


図 13 導入遺伝子の周囲に眼胞が陥入する。A,B) エレクトロポレーションで遺伝子を取り込んだ細胞を、共導入した lacZ レポーター遺伝子によって可視化した。A) Sgx-1 を導入した場合。Sgx-1 を導入した細胞の周辺に眼杯が陥入している。眼杯そのものと水晶体胞では導入遺伝子の発現が見られない。陥入した眼杯は両者共に肥厚し、神経性網膜に特異化しつつあることを示す。B) 対照胚。正常な眼の形態を呈する。水晶体に導入遺伝子の発現が見られ、水晶体そのものがエレクトロポレーションで遺伝子を受け取ることができることを示す。C,D) 外来の Sgx-1 の発現を Sgx-1 に連結した FLAG epitope に対する抗体で同定した。C) Sgx-1 を 2 カ所の狭い領域に導入した場合、それぞれの周囲に眼胞の陥入が生じた。この標本では水晶体胞の形成は観察されなかった。2 カ所の導入領域の間では陥入が起きていないだけでなく、肥厚が生じていない。バーは 100 μ m D) 表面外胚葉の広い領域に導入した場合、眼胞が外に膨張した形態を示す。Sgx-1 を導入した領域に接する眼胞は肥厚し、神経性網膜に分化している。

も正常胚と同様に肥厚しており、黄褐色色素上皮細胞に分化する眼窩内層の細胞は、正常胚と対照的で、神経性眼窩に分化しつつあることを示した。

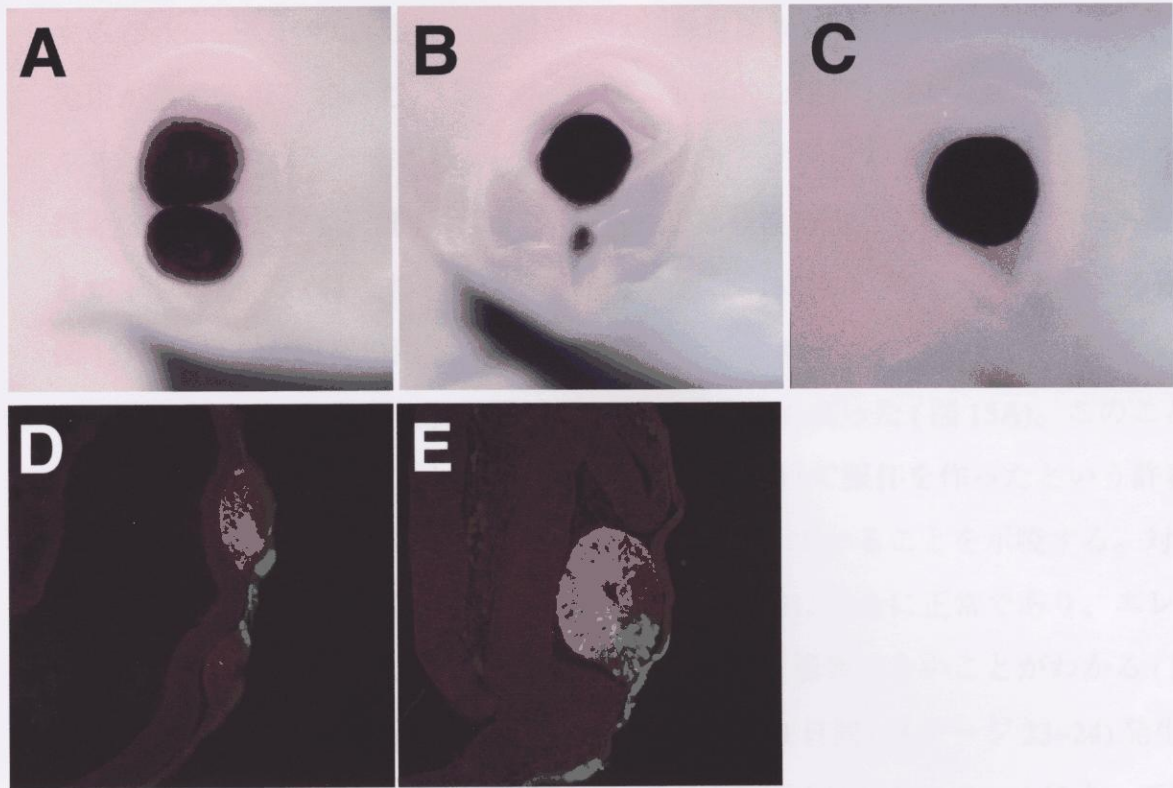


図 14 重複した水晶体胞は水晶体のマーカ遺伝子の発現を示す。A~C) L-maf の発現。A,B) 重複した水晶体はどちらも正常な形態を示し、どちらも強く L-maf の発現を呈した。B) 小さな二次水晶体が形成された例。L-maf の強い発現が見られ、水晶体プラコード様の形態を示す。C) 対照胚の L-maf の発現パターン。E,F) δ -crystallin の発現と Sgx-1 を発現する細胞の位置関係。遺伝子を導入した細胞を GFP(緑)で、 δ -crystallin の発現を赤で示す。E) Sgx-1 を導入した場合、導入細胞の周囲に水晶体が形成されている。Sgx-1 を導入した細胞では δ -crystallin の発現が見られない。F) 対照胚。

も正常胚と同様に肥厚しており、将来色素上皮細胞に分化する眼杯外層の薄い上皮と対照的で、神経性網膜に分化しつつあることを示した。

網膜へ分化が進んでいることを示すため、神経性網膜の指標遺伝子 Rx の発現を調べた。Rx はこの時期に予定神経性網膜領域である眼杯内層に限局して発現する (Sakagami, 1999)。重複した眼杯では神経性網膜領域で特異的な Rx 遺伝子の発現が強く発現していた。(図 15A, B, D)。異所的な眼杯(図 15A, B で矢尻で示した)発現の強さは、本来の眼杯(矢印で示した)と同程度かより強い。形態的な特徴と併せて考えても、異所的な眼杯の内層が神経性網膜として分化しつつあることが示された。Rx は重複した眼杯を通して連続的に発現していることもあるが(図 15)、重複した眼杯の距離が離れている場合、それぞれの眼杯で Rx が強く発現し、その間に Rx の発現が弱い領域が存在することもあった(図 15A)。このことは、Sgx-1 がすでにつくられた網膜領域を二つに分けて眼杯を作ったという許容的な制御にとどまらず、網膜の分化を積極的に誘導していることを示唆する。対照としてベクターのみを導入した胚では、眼は形態的に完全に正常であり、エレクトロポレーションそのものが眼の形態形成に及ぼす影響はないことがわかる(図 12C, F, 図 13B ほか)。Sgx-1 を導入してからさらに4日間(ステージ 23~24)発生させて、異所的な眼杯が網膜に分化するか確かめた(図 16A, B)。Sgx-1 によって眼杯が重複した胚では、本来色素上皮細胞が存在する眼胞腹側に、異所的な眼杯の陥入に由来すると思われる胞があり、胞全体が神経性網膜に特徴的な厚く肥厚した神経芽細胞の層を形成していた。異所的網膜の周囲には隣接した切片も含め水晶体は形成されていなかった。正常胚では眼杯が膨張して巨大な眼球となるが、異所的な網膜では胞内にはほとんど空間がなく、組織は折り畳まれて襞のようになっている。眼球内の静水圧(眼圧)が眼球の成長に必要である(Coulmbre, 1956; Wilkinson and Hodos, 1991)。異所的網膜胞は周囲に対して開放されており、そのため眼圧が上がらず成長しなかったのかもしれない。

導入した *Sgx-1* のパターンと眼杯の重複の位置関係

エレクトロポレーションで導入した外来 *Sgx-1* の発現を同時に導入した *lacZ*

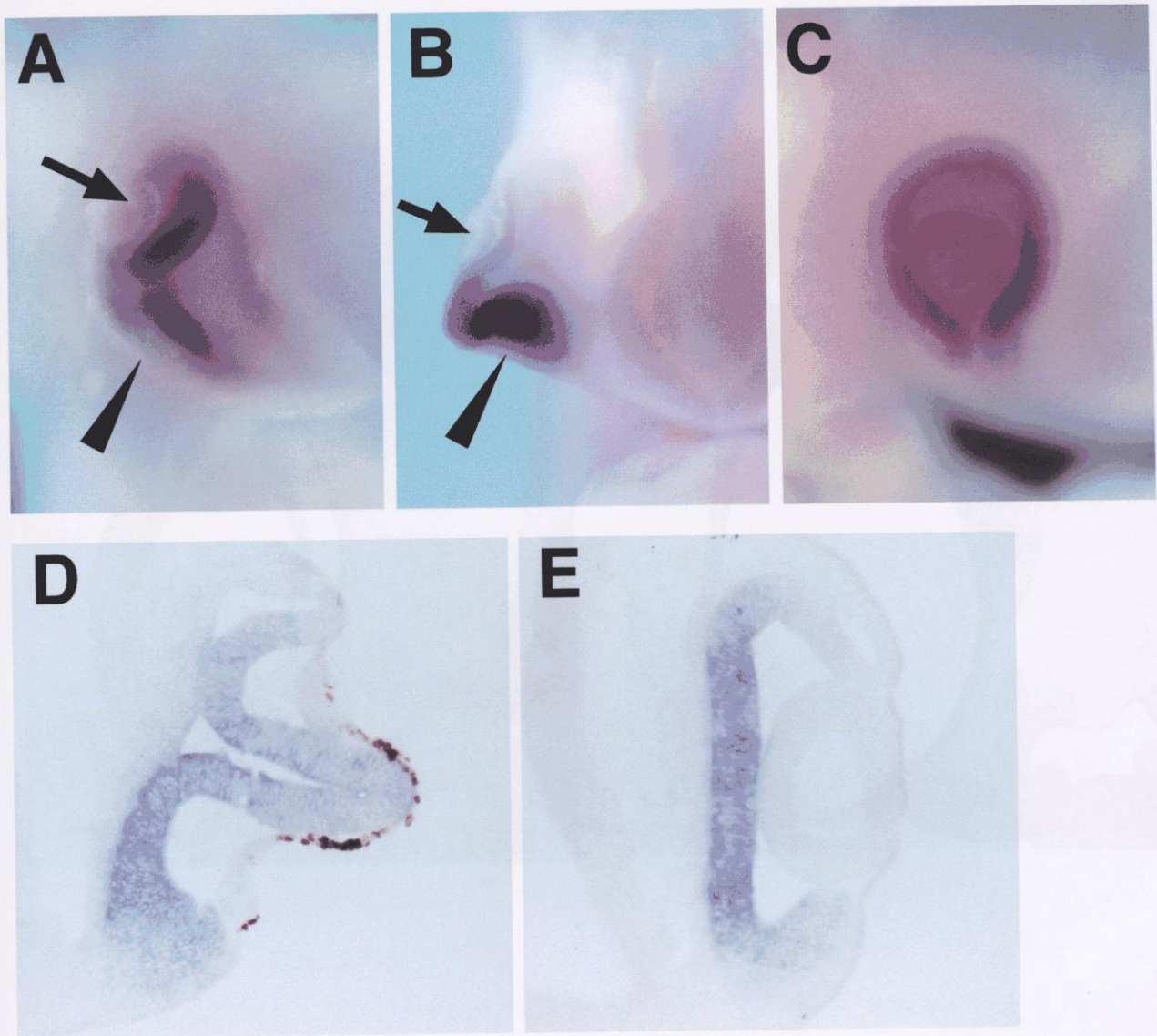
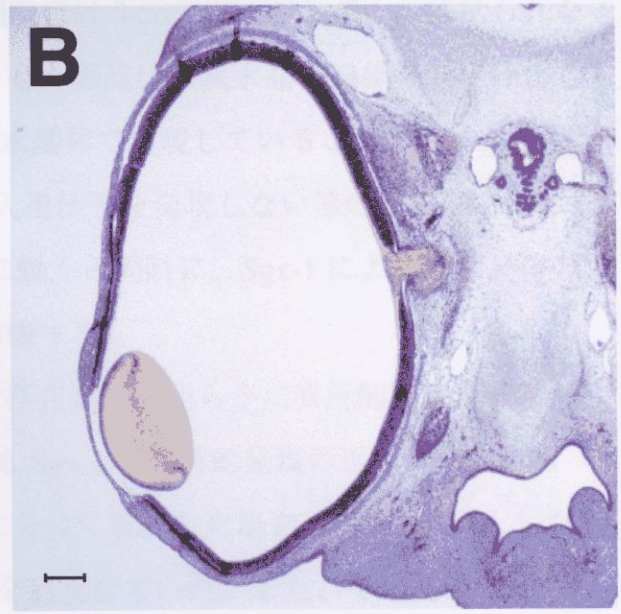
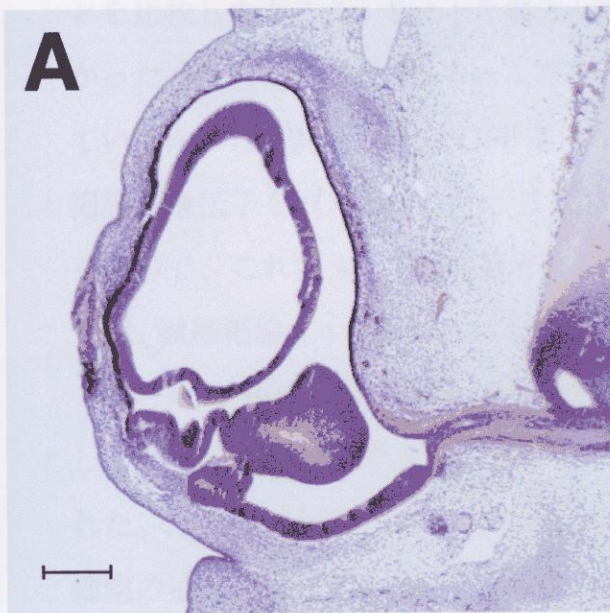


図 15 重複した眼杯は神経性網膜の初期マーカーの発現をしめす。A~C) ホールマウントで調べた Rx の発現。A) 本来の眼杯と異所的に形成された眼杯のそれぞれで Rx の発現が発現していた。二つの眼杯の Rx の発現は不連続であることがわかる。B) Rx の発現は異所的な眼杯における発現は、正常胚と同等かより強い。C) 対照胚。E, F) 凍結切片に対し Rx (紫) と導入した Sgx-1 の発現 (ブラウン) を二重染色で調べた。E) 重複した眼杯のそれぞれが Rx を強く発現している。この標本ではどちらが本来の眼杯か不明である。F) 対照胚。矢印は本来の眼杯。矢尻は異所的な眼杯で、矢尻の近傍に導入遺伝子の発現が見られた (データ示さず)

遺伝子の発現、または外来の *Sgx-1* に連結した FLAG エピトープに対する抗体を用いて同定し、*Sgx-1* によって生じた異所的な眼杯、水晶体の構造と比較した。対照胚では DNA を注入した場所を反映し、表皮外胚葉と水晶体の領域に遺伝子が導入されたが、*Sgx-1* を導入した胚では導入遺伝子の発現は水晶体細胞には見られず、異所的な水晶体の近傍の表皮外胚葉に存在していた。これは *Sgx-1* が異所的な水晶体形成に限定し、局所的 (non-cell-autonomous) に作用していることを示している (図 16C, D)。また特に水晶体細胞層で強い β -crystallin の発現と遺伝子導入のパター



は領域は肥厚も陥入もしていなかった (図 13C)。二次眼の陥入は $120\mu\text{m}$ 程度であり、その間に $120\mu\text{m}$ の長さで肥厚しない領域が見られた。*Sgx-1* による眼杯の誘導は $100\mu\text{m}$ ないしそれ以下の比較的短い距離に対して有効であると考えられる。同様の切片も含め、水晶体は眼杯の異所的な陥入の周囲には形成されなかった (データは示さず)。*Sgx-1* による眼杯の陥入は、重複した水晶体による二次的なものではないらしい。

眼杯や眼結膜などの構造は規則にしか観察されないこと (図 12A) など、形態的な特徴から、眼杯の管腔方向の軸性に変化がないことが示唆される。*Sgx-1* が眼杯の管腔軸に作用を及ぼしていないか調べるため、重複した眼杯での管腔および管腔外での遺伝子の発現を調べた。Tbx5 は眼杯の管腔に限定して発現する

図 16 A) *Sgx-1* 導入 4 日後の眼の形態。本来眼杯の腹側に二次眼球が形成されている。本来色素上皮に分化するはずの領域が網膜に分化している。B) 対照胚 バーは $200\mu\text{m}$ を示す。

遺伝子の発現、または外来の Sgx-1 に連結した FLAG エピトープに対する抗体を用いて同定し、Sgx-1 によって生じた異所的な眼杯、水晶体の場所と比較した。対照胚では DNA を注入した場所を反映し、表皮外胚葉と水晶体の領域に遺伝子が導入されたが、Sgx-1 を導入した胚では導入遺伝子の発現は水晶体胞には見られず、異所的水晶体の近傍の表面外胚葉に存在していた。これは Sgx-1 が異所的水晶体形成に細胞非自律的 (non cell-autonomous) に働いていることを示唆している (図 13C, D)。また特に水晶体繊維細胞で強い δ -crystallin の発現と遺伝子導入のパターンを比較したところ、Sgx-1 を導入した細胞には δ -crystallin のシグナルは見られなかった (図 14C)。つまり、Sgx-1 を発現させた細胞は一次水晶体繊維細胞に分化していなかった。対照胚では GFP 遺伝子が水晶体で発現していることから、水晶体細胞が遺伝子を取り込まない、または導入遺伝子を発現しない等の原因は考えにくいので、これは Sgx-1 が細胞非自律的に働くと同時に、Sgx-1 によって水晶体の分化 (繊維細胞化) が抑制されることを示唆する。

一方、眼杯には導入遺伝子の発現は存在せず、明らかに異所的な眼杯形成に対しても細胞非自律的であり、眼杯の形成も Sgx-1 の異所的発現の近傍にのみ見られた。Sgx-1 を比較的狭い領域に二カ所に分けて導入した場合、Sgx-1 を導入した細胞の近傍だけが陥入し、二カ所の眼杯を形成していた。また、その間に挟まれた領域は肥厚も陥入もしていなかった (図 13C)。二カ所の陥入は $220\mu\text{m}$ 離れており、その間に $120\mu\text{m}$ の長さで肥厚しない領域が見られた。Sgx-1 による眼杯の誘導は $100\mu\text{m}$ ないしそれ以下の比較的短い距離に対して有効であると考えられる。隣接する切片も含め、水晶体は眼杯の異所的な陥入の周囲には形成されていなかった (データは示さず)。Sgx-1 による眼杯の陥入は、重複した水晶体による二次的なものではないらしい。

眼柄や脈絡溝などの構造は腹側にしか観察されないこと (図 12A) など、形態的な特徴から、眼杯の背腹方向の軸性に変化がないことが示唆される。Sgx-1 が眼杯の背腹軸に影響を及ぼしていないか調べるため、重複した眼杯での背側および腹側のマーカー遺伝子の発現を調べた。Tbx5 は眼杯の背側に限局して強い発現を示し、眼杯の最も背側の領域を規定している (図 17B) (Takeuchi et al., 投稿中)、

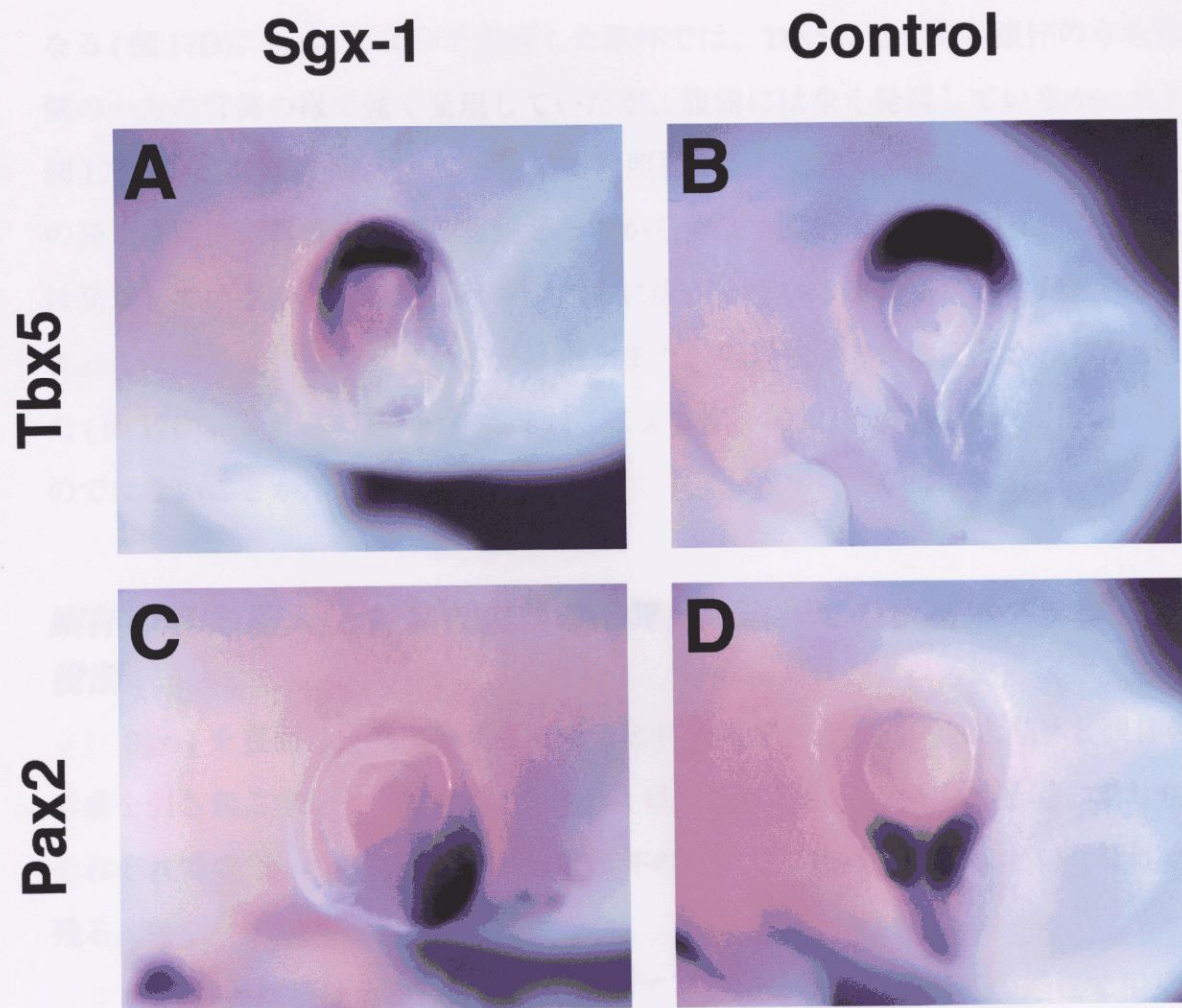


図 17 A) Sgx-1 による眼杯の重複は眼杯の背腹極性の重複によるものではない。A,B) 眼杯の背側マーカー Tbx5 の発現パターン。C,D) 眼杯の腹側部と眼杯のマーカー Pax2 の発現。A,C) Sgx-1 を導入し重複した眼杯 B,D) 対照胚の眼杯。Tbx5 の発現は眼胞全体の最も背側の端で強く発現し、腹側の眼杯には発現が見られない。重複した眼杯の背側の一方の背側で発現している。同様に Pax2 は眼胞の腹側末端で発現し、背側の眼杯には見られない。Tbx5, Pax2 ともに発現領域は広がっていない。これらの胚では Sgx-1 は腹側の眼杯周辺に導入されていた。

Pax2 は眼柄と眼杯の腹側 (脈絡溝周辺) で強く発現し、腹側構造の領域の指標となる (図 17D)。Sgx-1 によって重複した眼杯では、Tbx5 は 2 つある眼杯のうち背側の一方の背側の縁で強く発現していたが、腹側には全く発現していなかった (図 17A)。発現強度、拡がりに関しても対照胚の眼杯と差がみられなかった。Pax2 の発現は同様に腹側の眼杯の腹側とそこから伸びる眼柄に見られ、背側の眼杯には発現していなかった。発現は多少前方に広がっているように見えるが、標本によっては全く変化を受けていなかった。また、発現強度も対照胚とかわらなかった (図 17C)。これらの結果から、Sgx-1 による眼杯の重複が背腹軸の変化によるものではないことが示された。

眼杯の形成(陥入)と神経性網膜の特異化の過程での水晶体プラコードの役割

Sgx-1 を表面外胚葉に発現させることによって、その周囲に水晶体と眼杯の形成を引き起こすことができたが、Sgx-1 は水晶体と眼杯の両方で発現しており、それぞれの Sgx-1 の発現が水晶体と眼杯のどちらに作用するのかという疑問が残る。

水晶体と網膜はその形成過程において互いの分化、形態形成の過程で相互に誘導を行うことで形成されると考えられている。たとえばステージ 10 に予定水晶体外胚葉 (PLE) を除去した胚では、操作後 4 日目までに NR-PE の極性が失われることが報告されており (Hyer et al., 1998)、眼胞に由来する外胚葉性の網膜組織の遠近位軸の極性、すなわち神経性網膜 (NR)- 網膜色素上皮 (PE) の領域化の決定は予定水晶体外胚葉に依存すると考えられている。しかしながら、神経性網膜 (Rx, Chx10) (Casarosa et al., 1997; Furukawa et al., 1997, Sakagami, 1999, Liu et al., 1994) ・ 網膜色素上皮の指標遺伝子 (Mitf) の発現パターン (Mochii et al., 1998) は、眼胞形成直後にすでに NR-PE 極性が眼杯に存在することを示唆し、先の実験発生学的な根拠とは矛盾する。また、このような操作による極性の喪失は予定水晶体外胚葉の不在によるものなのか明確でない。たとえば、外科的処置によって、網膜色素上皮の分化を誘導する頭部間充織細胞が眼胞のより側方部に浸潤するためなのかも

しれな。そこで外科的処置実験をより厳密に行うことによって、水晶体や網膜を取り囲む周囲の組織がNR-PEのパターンの形成にどのように影響するのか解析を試みた。

まずステージ12(眼胞期)のニワトリ胚予定水晶体外胚葉を外科的に取り除いた(図18)。ステージ18まで発生させ、形態的なまたは遺伝子発現パターンの特徴を調べた。正常胚の場合、この時期には水晶体が表面外胚葉から分離し水晶体胞を形成している。眼胞は陥入して内層と外層の2つの層から構成される眼杯を形成する(図19E)。

予定水晶体外胚葉を除去することで、ほとんどの場合水晶体(水晶体プラコード)の形成をさまたげることができた。これは切片を作成し水晶体の特に水晶体繊維細胞を特異的に認識する δ -crystallinで染色することによって確認できた(図19F, Gと比較)。この胚では眼胞が側方に膨張し、陥入前のステージ12~13の正常胚の眼胞とよく似た形態を持っていた(図19A)。組織切片を作製しハマトキシリン-エオシン染色して観察したところ、水晶体繊維細胞が欠失した標本では眼胞側方部の眼胞内部への陥入が全く見られなかった(図19C)。本来神経性網膜を形成する眼胞の側方壁は、近部(すなわち色素上皮細胞に分化する領域)に比べ多少肥厚しているものの、正常胚よりも薄く、明らかに神経性網膜の分化が不十分ではないことを示している。この標本では眼胞の周囲に細胞は存在せず、直接胚体外に露出していることから、予定水晶体外胚葉除去後その跡は修復されていないことがわかる。陥入しなかった眼胞は本来の網膜と同程度の大きさ(背腹軸方向の長さ)まで成長しており、眼胞の成長は水晶体に依存していなかった。

予定水晶体外胚葉を除去した胚の本来神経性網膜となる領域(眼胞の側方部)が神経網膜細胞に特異化しているかどうか調べるため、神経性網膜に特異的なRx遺伝子に対する*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。PLE除去胚ではRxは眼胞の側方部では腹側領域で発現していたものの、シグナルは正常な眼杯に比べ非常に弱く、とくに眼胞の背側では全く発現が見られなかった(図20A)。色素上皮細胞のマーカーであるMitfの発現は正常胚同様、眼胞の側方部には見られず、眼胞の前脳に近い側に限局していた。眼胞の側方部は色素上皮細胞に分化し

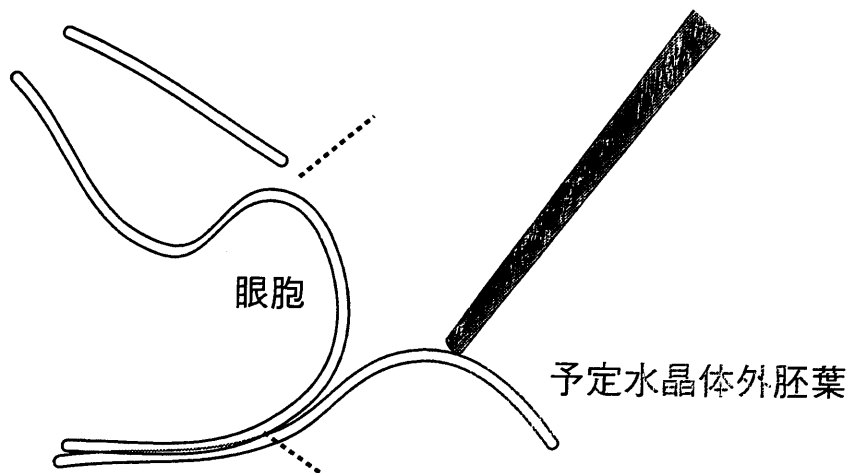
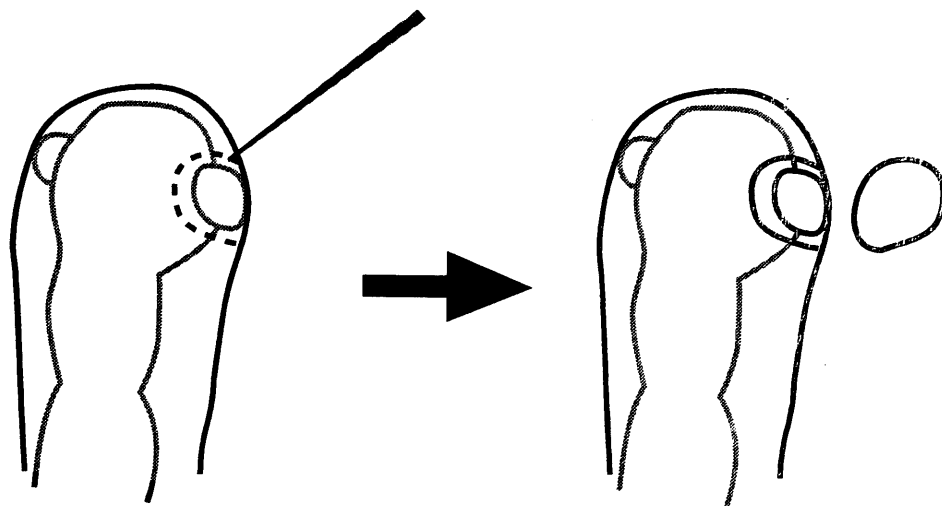


図 18 予定水晶体外胚葉 (PLE) 除去実験の模式図。水晶体プラコードが肥厚する以前 (ステージ 12) の眼胞周辺の表面外胚葉層を剥がして 8 時間 (ステージ 14) または 24 時間 (ステージ 18) 発生を進め、網膜発生に及ぼす影響を調べる。

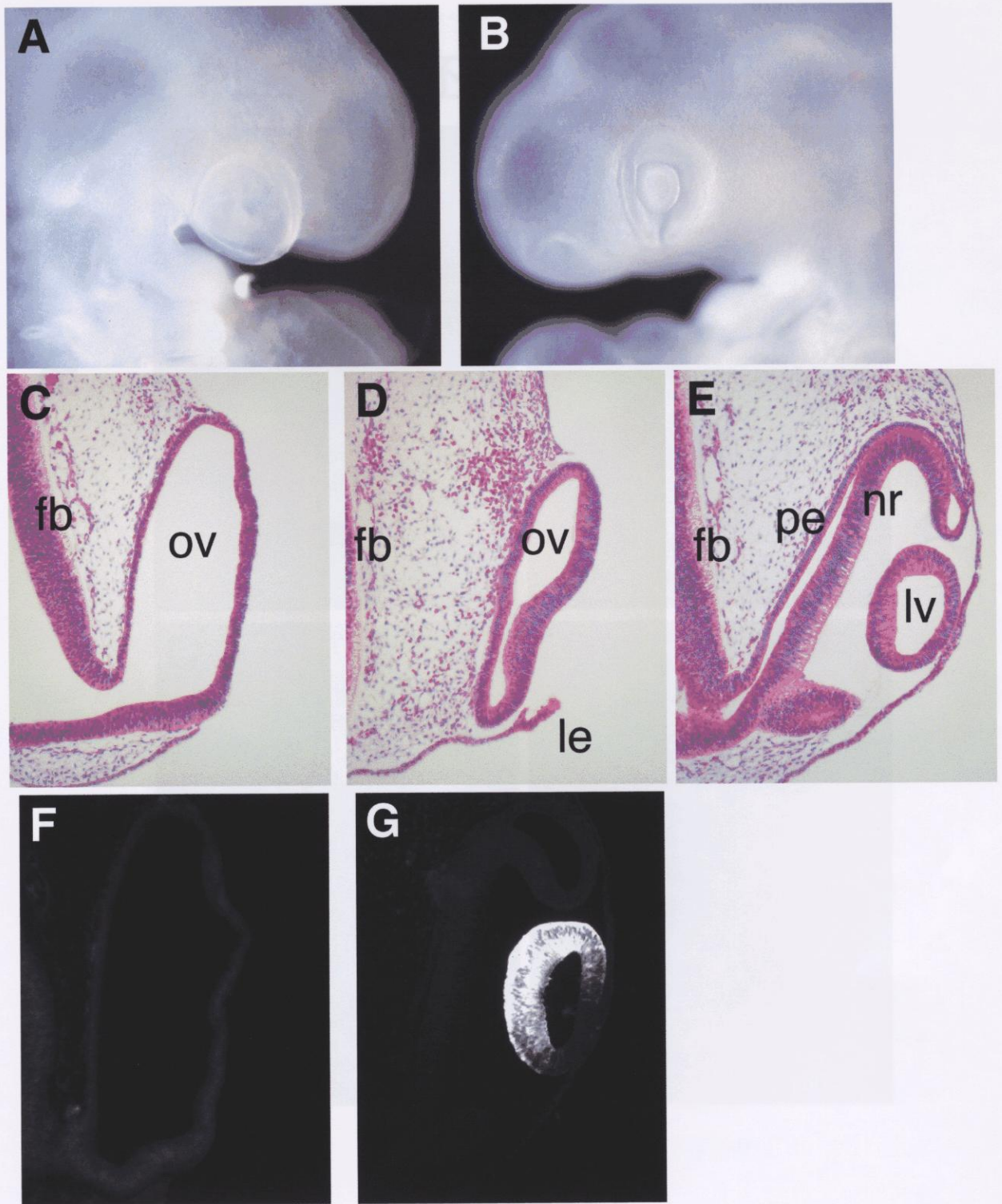


図 19 眼杯の陥入と神経性網膜の分化には水晶体プラコードが必要である。A,C,D,F) ステージ 12 に予定水晶体外胚葉を外科的に取り除き、ステージ 18(約 24 時間後)まで発生させた。B,F,G) 対照(反対側の眼)。A, C) 眼胞と接触する表面外胚葉は存在していない。本来陥入し眼杯内層を構成する遠位部は全く陥入が見られず、神経性網膜の分化がほとんど進行していない。ただし、わずかに肥厚し、proximal-distal の差が生じている。F) d-crystallin を発現する水晶体繊維細胞は完全に取り除かれている。A, C, F) は同一標本。D) 水晶体上皮の領域が残った場合、網膜はそこを境目として陥入する。正常胚の眼杯は陥入し、内層は肥厚して神経性網膜に特異化している。G) 正常胚の水晶体では非常に強く d-crystallin が発現している。A, B) 側方から見た眼の形態。C, D, E) Hematoxylin-Eosin 染色像。E, F) d-crystallin 染色像。上が背側、右が側方。ov: 眼胞、le: 水晶体上皮細胞、pe: 網膜色素上皮、nr: 神経性網膜、lv: 水晶体胞。fb: 前脳

PLE 除去胚

正常胚

Rx



Mitf



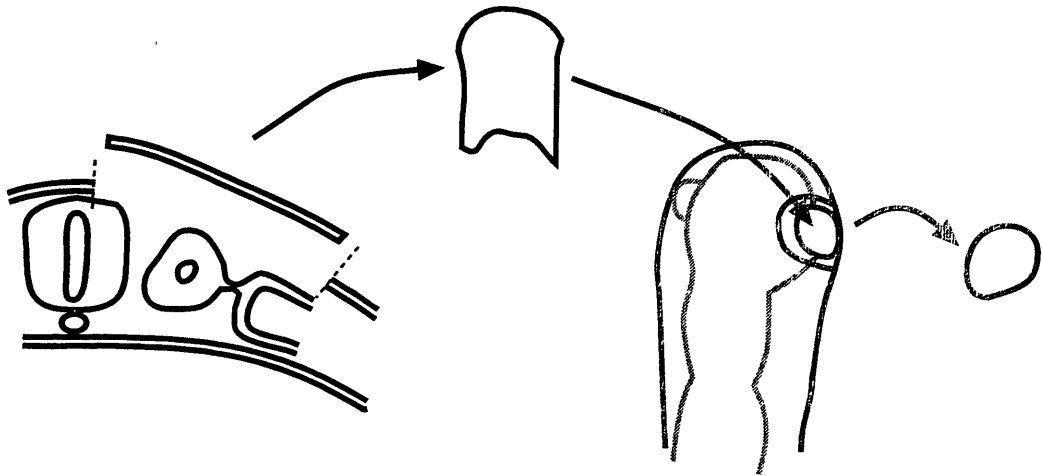
図 20 PLE 除去胚の眼胞の側方部では神経性網膜としての性質は失われつつある (または分化が促進しない) もの、全体としての遠近位軸性は失われていない。A) PLE 除去後 24 時間後 (ステージ 18) の眼胞における Rx の発現。Rx は PLE 除去胚でも存在するものの、正常に比べ著しく弱い。B) 同時期の正常胚での Rx の発現。眼杯内層 (神経性網膜) に一致する強い Rx の発現が見られる C) PLE 除去胚での Mitf の発現、眼胞側方部は網膜色素上皮には分化していない。D) 正常胚における Mitf の発現。A および C は図 19 の C, F と同一の標本であり、完全に水晶体を除去したことを確認している。

ているわけではないことが示される(図 20C)。予定水晶体外胚葉を除去した場合、眼杯の遠近位軸方向の領域分化(NR/PE 領域分化)そのものは存在しているものの、本来水晶体と近接している側方領域で神経性網膜の性質が失われつつあることを示している。この結果は形態的な特徴とも良い一致を示す。水晶体プラコードが眼胞の側方部、つまり神経性網膜の性質が維持されるために必要で、この領域の陥入と神経性網膜への分化の進行を制御していることが、遺伝子発現と組織形態の両方から示唆される。

網膜の分化と陥入が、単純に眼胞を取り囲む表面外胚葉細胞の有無に依存しているのか調べるために、予定水晶体外胚葉除去後、同時期の水晶体に分化しない体幹部の表皮外胚葉を移植し、24時間発生させた後に網膜の形成を調べた(図 21A)。移植の際に宿主体(host)としてはニワトリ胚を用い、供与体(donor)としてはウズラを用いた。この場合も予定水晶体外胚葉を除去しただけの胚と同様に眼胞は側方に拡張する形態を示した。切片を作製し観察したところ、陥入も全くおきていないことが明らかであった(図 22A)。ドナー由来の細胞をウズラの核を特異的に認識する抗体(QCPN)を用いて染色したところ、眼胞を取り巻くウズラ由来の表皮外胚葉が染色された(図 22A)。

逆に眼杯の陥入が水晶体に依存的であることを示すために、予定水晶体外胚葉除去後水晶体プラコードの細胞を移植し、眼杯の陥入と神経性網膜分化を回復させられるかどうか調べた。肥厚、陥入しつつある水晶体胞(ステージ 14)を単離し、ステージ 12 の予定水晶体外胚葉を除去した胚の眼胞の付近に移植した(図 21B)。水晶体細胞を移植した予定 PLE 除去胚の眼胞は、QCPN によって染色される移植された水晶体の周辺に陥入を生じていた(図 22B)。陥入して生じた眼杯内層は神経性網膜特有の肥厚した形態を示し、この領域が神経性網膜へと分化していることを示した。つまり水晶体を移植することによって眼杯の陥入と神経性網膜の特異化が回復した。これらの結果から眼杯の陥入と網膜への分化は眼胞を取り巻く表面外胚葉の存在によるのではなく、水晶体プラコードに依存した現象であることがわかる。先の結果も併せると、水晶体プラコードが眼杯の陥入と分化を誘導していることが示された。

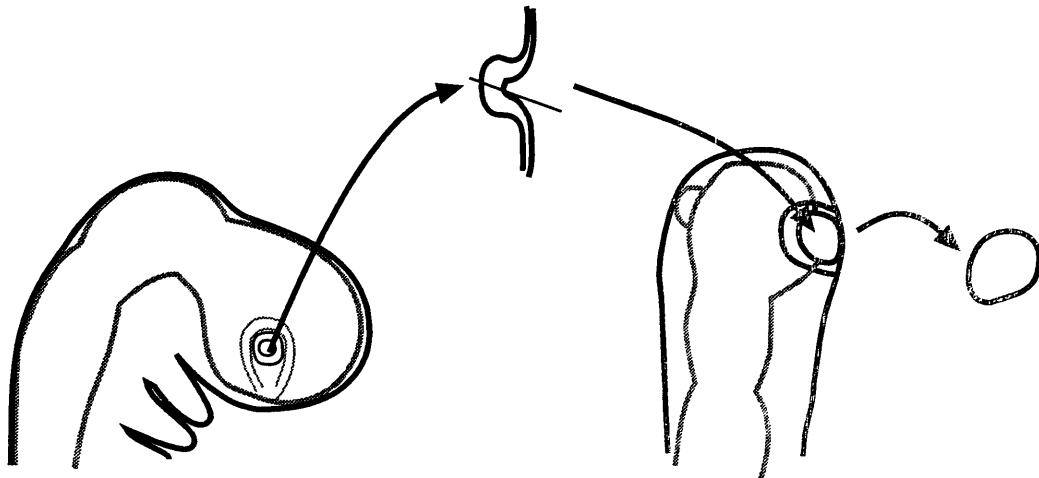
A 非水晶体外胚葉 (表皮外胚葉) 移植実験



Donor: quail trunk ectoderm, st.14

Recipient: chicken (eliminated PLE) st.12

B 水晶体プラコード移植実験



Donor: quail lens placode, st.14

Recipient: chicken (eliminated PLE) st.12

図 21 眼胞の陥入が水晶体プラコードに依存的であることを示す二つの実験。A) 水晶体とは関係のない表面外胚葉 (表皮) を移植することで、陥入が表面を取り囲む外胚葉の存在そのものに依存するか (水晶体と無関係か) 調べる。B) 予定水晶体外胚葉除去後、ウズラの水晶体プラコードを移植することで、眼杯の陥入等が回復するか調べる。

Sgx-1は水晶体ブラコート非存在条件下で眼胞で発現する

Sgx-1を衣向側に移植し、陥入させることにより、眼杯の陥入と網膜の分化を引き起こすことができ、また水晶体ブラコートの陥入に必要であることが示された。これらの一連の結果から、Sgx-1が網膜に発現し、Sgx-1の発現阻害によって眼杯の陥入が誘導されることを考え、この場合ブラコートにおけるSgx-1の機能によって、眼杯の陥入と分化が制御されていることが示された。

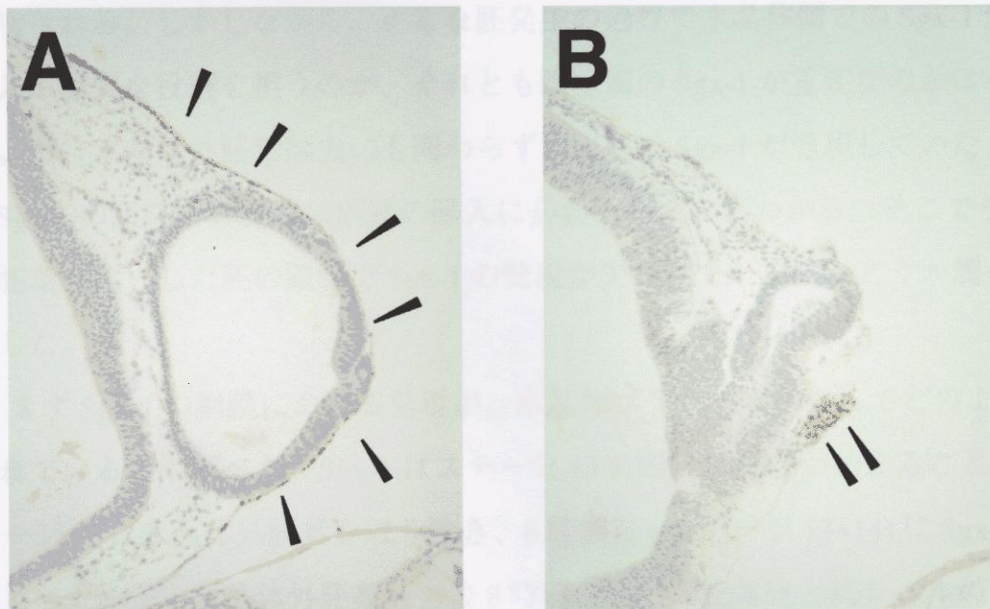


図 22 予定水晶体外胚葉を除去することによって欠損した眼胞の陥入は水晶体を移植することで回復する。A) 予定水晶体外胚葉を取り除いた後、体幹部の表皮外胚葉を移植した場合。眼胞を取り囲む細胞があっても眼杯は陥入しない。網膜も分化していない。B) 水晶体外胚葉を移植した場合、移植した水晶体胞を中心に陥入が生じていることが分かる。陥入した領域は肥厚し、神経性網膜に分化している。矢印で示した細胞は QCPN 抗体で染色された供与体由来の細胞。

Sgx-1 は水晶体プラコード非存在下で眼胞で発現する

Sgx-1 を表面外胚葉で発現させることによって、その直下の眼胞に陥入と網膜への分化を引き起こすことができ、また水晶体プラコードが眼胞の陥入に必要であることが示された。これらの一連の結果と、Sgx-1 が水晶体で発現し、Sgx-1 の異所的発現によって眼杯の陥入が誘導されたことを考えると、水晶体プラコードにおける Sgx-1 の機能によって、眼杯の陥入と分化が制御されていることが強く示唆される。しかしながら、正常な胚発生の過程で水晶体側での Sgx-1 が眼胞の陥入に重要な役割を担うのか、それとも眼胞側の Sgx-1 が重要なのかは不明である。予定水晶体外胚葉除去にも関わらず、眼胞で Sgx-1 が発現していたとすれば、Sgx-1 の眼杯での発現は網膜の陥入に必要ないことがわかる。そこで予定水晶体外胚葉を除去した胚の眼胞で Sgx-1 の発現が失われていないかどうか調べることにした。

まず Sgx-1 の網膜における発現が、水晶体プラコードによってどのように調節されているのか調べた。Sgx-1 はステージ 12 に眼杯で発現が始まることから、ステージ 12 に水晶体外胚葉を取り除き、8 時間後 (ステージ 13~14) に Sgx-1 の発現を調べた。予定水晶体外胚葉除去後 8 時間の胚では正常胚と同レベルの Sgx-1 の発現が眼胞内に見られた (図 23A,B)。この時点で正常胚の水晶体プラコードと眼杯がわずかに陥入しているが、PLE 除去胚では眼杯は陥入していなかった。眼胞周辺に細胞 Sgx-1 陽性細胞が存在しないことから、水晶体予定外胚葉が完全に除去されたことが示される。さらに発生を進め、眼杯が完全に陥入し、神経性網膜と網膜色素上皮の特異化が明確に観察されるステージ 18 (約 24 時間後) で調べたところ、Sgx-1 の水晶体での発現は、陥入していない眼胞の側方部の中央付近、腹側、そして近位部の腹側に発現が見られた (図 23C,D)。眼杯側方の発現は正常胚の眼杯の背側の縁での発現と同程度のシグナル強度を示した。直接比較できないものの、側方部での発現はおそらく正常胚の眼杯での発現に相当すると考えられ、Sgx-1 の眼杯での発現はステージ 18 まで水晶体プラコード (水晶体胞) の存在に依存しない。この標本は、Sgx-1 を強く発現する一方で、PLE 除去によって眼杯は陥入しておらず、また網膜の分化も進行していない。このことから Sgx-1 の眼

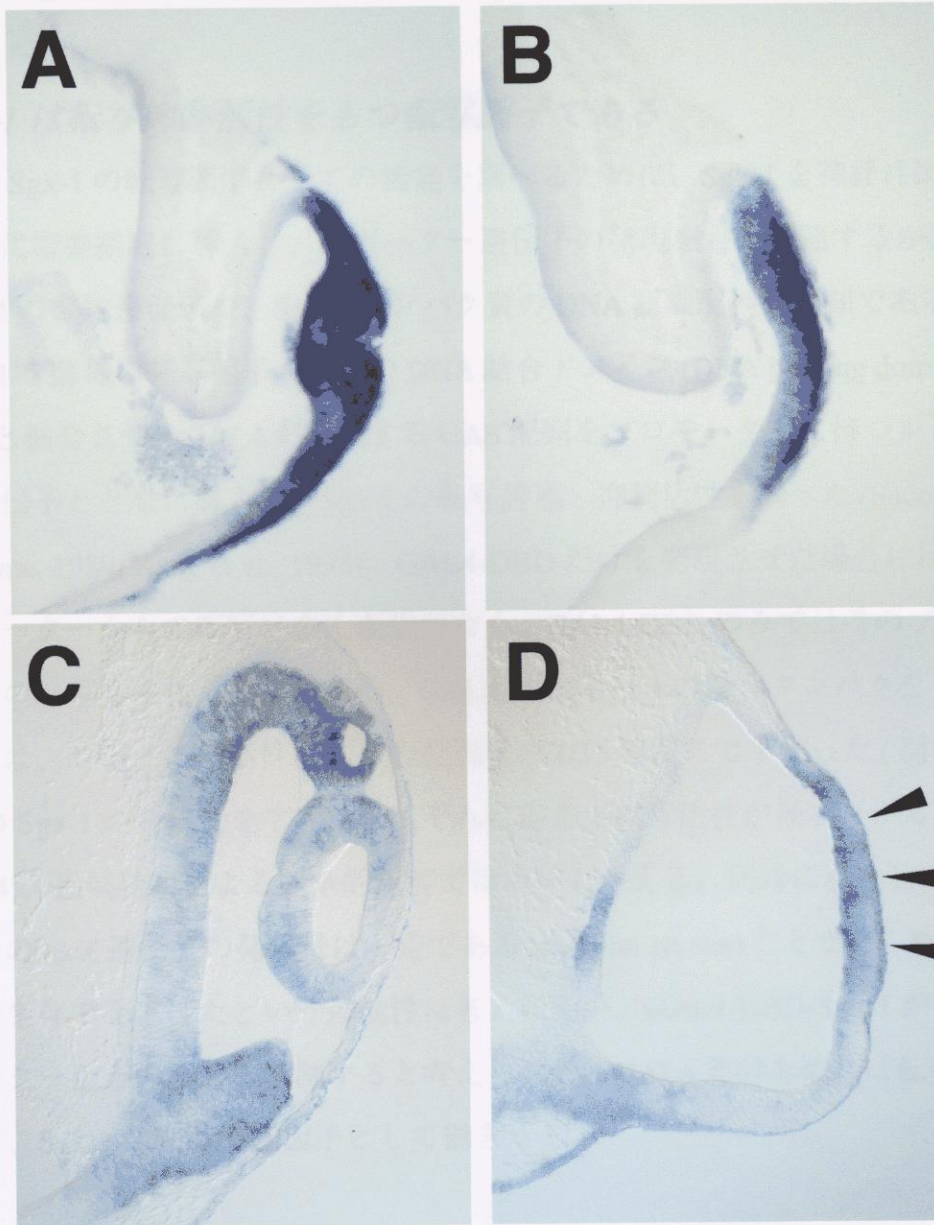


図 23 眼胞での Sgx-1 の発現は水晶体プラコードに依存しない。ステージ 11~12 に予定水晶体外胚葉を除去し、ステージ 14 (A, B), ステージ 18 (C, D) に Sgx-1 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。A, C) 予定水晶体外胚葉を除去した場合。眼杯側方部で強い Sgx-1 の発現が観察される。その発現は正常胚と同程度かわずかに弱い。C) Sgx-1 は眼胞で発現しているにもかかわらず、陥入は全く生じていない。B, D) 正常胚。

胞での発現だけでは眼胞の陥入を引き起こさないことを示唆している。

Sgx-1 は転写抑制活性をもつ転写因子である

Sgx-1 の転写因子としての機能を調べるために、Sgx-1 を神経性網膜組織からの初代培養細胞に導入し、レポーター遺伝子の発現をどう調節するか調べた。Sgx-1 の標的遺伝子や、Sgx-1 タンパク質の DNA 認識配列が未知であるため、Sgx-1 を酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (DNA binding domain、DBD と略) と融合させ、GAL4 が認識する UAS 配列をプロモーターに持つシフェラーゼ遺伝子とともに導入し、Sgx-1 の転写誘導・抑制活性を調べた (Sadowski and Ptashne, 1989; Kang et al., 1993)。GAL4-DBD だけを発現させた場合には、UAS-プロモーターからの転写は全く変化がなく、GAL4-DBD のみではこのプロモーターからの転写を変化させなかった。GAL4-DBD-Sgx-1 の融合タンパクを発現させた場合は、レポーター活性は本来の発現量の 1/15 程度まで下がった (図 24)。GAL4-DBD-Sgx-1 の発現量を下げると、それに応じて転写活性が漸次下がることから (図 24)、過剰発現による競争的阻害ではないといえる。同時に導入した導入効率測定用の lacZ 遺伝子の発現量は一定である (data not shown) ことから、DNA 導入細胞の生存率を下げたという可能性は考えにくい。GAL4-DBD-Sgx-1 が UAS-プロモーターからの転写を抑制すると考えられる。GAL4 そのものには転写調節能がなく、Sgx-1 は転写抑制因子として働きうる。

Sgx-1 の眼胞における発現は眼杯と水晶体の形成に必要である。

Sgx-1 の機能を阻害する目的で、内在性の Sgx-1 に対して遺伝的に優性に働き、Sgx-1 の機能を抑制するドミナントネガティブ型の Sgx-1 変異体 (dnSgx-1) を設計した。ヘルペス単純ウイルスタンパク VP16 の強力な転写活性化ドメイン (VP16-AD) を融合することで、他の転写因子に転写活性可能を付与できることから (Sadowski et al., 1988)、本来転写抑制活性を持つ Sgx-1 に VP16-AD を融合することによって転写活性化型の Sgx-1 (dnSgx-1) を作製した。dnSgx-1 をマイクロエレクトロポレーション法を用いてステージ 9~10 の眼杯に導入し、ステージ 17 前

眼は正常を呈せ、dnSgx-1の眼に比べて異常を呈べた。同様にして、(16)の眼
みが発現させた。

dnSgx-1を導入した眼の眼胞は正常に形成されるべき眼杯に比べ厚く、
さく、また眼胞を構成する上皮層は全く肥厚。陥入が進んでいないという発現
状態を示していた(図25)。表皮外胚葉と眼胞の間には、眼胞から表皮上段への分
化全層型を構成する細胞が侵入しており、眼胞全体を取り囲んでいた。このため
眼胞と表皮の間には隙がなかった。また、水晶体は形成されておらず、予定

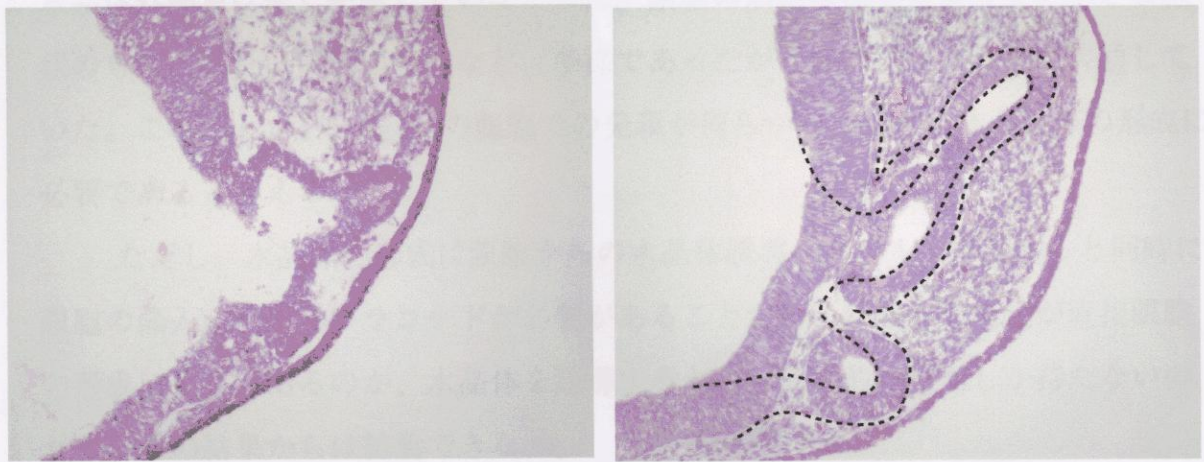


図25 dnSgx-1を発現させた眼胞の形態。ステージ9~10に導入し、ステージ16で
取り出して切片を作製した。明らかに神経性網膜細胞が分化していない。眼胞は胞
状のまま、陥入していない。予定水晶体領域は表皮に比べわずかに厚くなってい
るか、プラコードは形成していない。

後まで発生させ、dnSgx-1の眼に及ぼす効果を調べた。対照としてVP16-DBDのみを発現させた。

dnSgx-1を導入した胚の眼の原基は本来形成されるべき眼杯に比べ非常に小さく、また眼胞を構成する上皮層は全く肥厚、陥入が進んでいないという共通の形態を示していた(図25)、表面外胚葉と眼胞の間には、眼胞から色素上皮への分化を誘導する間充織細胞が進入しており、眼胞全体を取り囲んでいた。このため眼胞と表面外胚葉は接していなかった。また、水晶体は形成されておらず、予定水晶体外胚葉は全く肥厚していなかった。眼胞の形態は標本によって、小さな胞状のもの、細長い筒状のものなど、多様であったが、上に述べた特徴は共通していた。このことから、Sgx-1の眼胞での発現が何らかの形で水晶体と眼杯の形成に必要であるといえる。

ただし、水晶体の形成は眼胞からの水晶体誘導シグナルに依存すると同時に眼胞の陥入に水晶体プラコードが必要があることから、眼胞での発現が直接眼胞の形成に必要であるのか、水晶体を誘導するという間接的な役割しか持たないのかは、この結果からは結論できない。

考察

水晶体プラコードは眼杯の陥入と神経性網膜の分化に必要である

水晶体プラコードを形成する直前の予定水晶体外胚葉を外科的な操作で除去することによって、水晶体プラコードが網膜に及ぼす影響を調べることができる。今回異所的発現実験の結果から、眼胞の陥入と分化がステージ 12 以降の水晶体プラコードの存在に依存した現象であることが明らかになった。水晶体プラコードを取り除いた胚では眼胞は陥入せず、網膜の分化が進んでいないことを示した。水晶体プラコードを取り除いたあとに、表皮外胚葉を移植しても眼胞の陥入と分化はおきないことから、眼胞の陥入と分化は、近傍に存在する水晶体プラコードに依存した現象であることがわかる。表面外胚葉が眼胞と緊密に接触しすることによって網膜色素上皮分化を誘導する間充織が予定神経性網膜の近傍に侵入することを防ぎ、間接的に網膜の分化を誘導する(Lopashov and Stroeveva, 1961)とは考えにくい。

網膜の陥入や分化が水晶体プラコードに依存するものの、組織学的な特徴またはマーカー遺伝子 (Rx, Mitf) の局在は、予定水晶体外胚葉除去後も遠近位軸にそって明確な領域分化がおきていることを示した。水晶体プラコード非依存的に眼胞の Proximal-Distal 極性 (または NR-PE 領域特異性) が生じることを示している。初期の遠近位軸のパターンが予定水晶体外胚葉に依存しないかどうかは、今回の結果からは結論できないが、実際に水晶体プラコードが形成されるよりはるか以前、ステージ 9~10 前後には眼胞での Rx の発現が眼胞側方部の予定神経性網膜領域に限局していることが観察され (Sakagami, 1999)、眼胞の初期のパターンがステージ 9 前後の早い時期に既に確立されはじめていることを示している。今回は示していないが、ステージ 10 の早い時期に表皮外胚葉を除去しても Rx は眼胞側方腹部に限局した発現を示す結果が観察されている。おそらく、眼胞のパターン形成は水晶体によって一義的に決まるのではないのだろう。網膜のパターンニングには、次のような二つのステップが考えられる：遅くともステージ 12 以前に、おそらく前脳や眼胞そのものからの側方誘導によって、眼胞に遠近位軸のパ

ターンが生じる。その一方で、眼胞からの誘導によってステージ 13 以降に水晶体分化(水晶体細胞への特異化)がすすみ、さらに水晶体からの誘導によって二次的に網膜の陥入と分化が進むのだろう。現在のところ水晶体の分化を引き起こす眼胞からの誘導シグナルが何かはわかっていない。

Sgx-1 は水晶体と眼杯の肥厚陥入に伴って発現する

筆者らによってクローニングされたホメオボックス遺伝子、Sgx-1 は、これまで E2.5 の水晶体胞、眼杯、E4 の水晶体、網膜などでの発現が報告されていた (Deitcher et al., 1994)。今回新たにステージ 12~13 という、非常に早い時期に水晶体プラコード、眼胞でこれらの陥入に伴って領域特異的に発現していることが明らかになった。Sgx-1 の発現は網膜、水晶体の原基である眼胞の側方部とそれを取り囲む表面外胚葉の領域で発現が観察され、発生が進むと水晶体上皮細胞、眼杯の背側と鼻側に限局し、陥入する領域の周縁部に強いことが明らかになった。これまで、眼胞の網膜予定領域で特異的に発現する転写因子として Pax-6 (Walther and Gruss, 1991; Li et al., 1994; Grindley et al., 1995), Rx (Furukawa et al., 1997), Six3 (Bovolenta et al., 1998 #35; Oliver et al., 1995 #34), Otx1 (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993) 等が報告されている。これらは神経板期に神経板前方末端(網膜原基)に既に発現が見られる。それらと対照的に Sgx-1 は神経板期には全く発現しておらず、ステージ 12 の眼杯が陥入する直前に発現を開始している。水晶体でも同様に肥厚陥入に伴って発現が始まる。このことは Sgx-1 が水晶体と網膜の肥厚をともなう誘導に密接に関わった機能を持つことを示唆する。Sgx-1 はこれまで、眼杯、水晶体プラコードのみならず、耳プラコード、鼻プラコードなどの感覚器官プラコードでも発現していることから、外胚葉の肥厚すなわちプラコード形成に密接に関わっていることが示唆される。

Sgx-1 は水晶体の誘導を制御する

Sgx-1 をマイクロエレクトロポレーション法によって異所的に発現させたところ、Sgx-1 を発現する細胞の周囲に水晶体胞が異所的に形成された。異所的に形

成された水晶体胞は水晶体繊維細胞とそれを取り囲む水晶体上皮細胞からなる胞状の正常な水晶体胞の構造を示した。bZIP型転写因子L-mafを本来水晶体を形成しない表面外胚葉に強制発現させた場合、L-mafは導入した個々の細胞の運命を δ -crystallin陽性の水晶体細胞に転換することが報告されている(Ogino and Yasuda, 1998b)。L-mafの機能と比較することによって、Sgx-1は個々の細胞の分化を制御するのではなく、組織としての水晶体の形成を制御するオーガナイザーとして働くことが示唆される。Sgx-1の水晶体形成に及ぼす効果が非細胞自律的であること、Sgx-1そのものは転写因子であることを考えると、Sgx-1は細胞外シグナル伝達分子の発現制御を介して水晶体の形成を誘導しているのだろう。水晶体の形成には眼胞からの水晶体誘導が必要であると考えられており、Sgx-1は眼胞で発現していることから、Sgx-1が眼胞での水晶体誘導シグナルの発現を制御しているのかもしれない。

現在までに水晶体分化の誘導シグナルは同定されていない。水晶体誘導に関係する分子としてはTGF- β ファミリーに属すシグナル分子BMP-4が必須の役割を果たしていることが示唆されている(Furuta et al., 1998)。著者による予備実験では眼杯での発現が見られるBMP-4と類縁分子であるBMP-7は共にSgx-1の発現によって誘導されていなかった(データは示さず)。BMP-4単独では水晶体分化を誘導することはできず、直接の誘導シグナルが別に存在すると考えられる。Sgx-1の標的遺伝子の解析によって、水晶体誘導シグナルを同定できると期待される。

一方で、Sgx-1が単純に水晶体分化を抑制しているという可能性が考えられる。エレクトロポレーションによりSgx-1を導入した細胞は、異所的に形成された水晶体の中心部(水晶体繊維領域)には見られず、表皮外胚葉及び、重複した水晶体胞と表皮の接合部(すなわち水晶体上皮細胞)に存在していた。エレクトロポレーションによる遺伝子発現自体に細胞種依存性はないので、Sgx-1は水晶体上皮細胞から水晶体繊維細胞への分化の過程を抑制していることが示唆される。Sgx-1は正常な胚発生の過程で水晶体プラコード、水晶体上皮細胞に限局して発現し、水晶体繊維細胞では発現しないことから、Sgx-1は正常発生の過程で水晶体繊維細胞の分化を抑制する、または上皮細胞の性質を維持する役割を持つと考えて矛盾

がない。ただし、Sgx-1が水晶体の分化を抑制することによって、水晶体を分断し、水晶体を重複させたとは考えにくい。ドミナントネガティブ型のL-maf遺伝子を水晶体の一部に導入した場合、導入した細胞の水晶体分化を抑制し、場合によっては水晶体を二カ所に分断することが報告されているが、Sgx-1の異所的発現と異なり、おのおの水晶体は不規則な形態を示した(Ogino and Yasuda, 1998a)。つまり個々の細胞の水晶体への分化とは別に、何らかの水晶体の形成を制御するメカニズムが存在するらしい。Sgx-1による水晶体誘導によってそれらも含めた水晶体誘導を制御すると同時に、Sgx-1がそれを発現する細胞自身の水晶体分化を抑制していると考え等得れる。

Sgx-1の網膜分化に対する役割

Sgx-1を表面外胚葉にエレクトロポレーションを用いて導入した場合、水晶体が重複するだけでなく、眼杯が異所的に陥入した。陥入した眼杯は予定網膜領域に特異的なマーカー遺伝子を遺伝子を発現しており、神経性網膜に分化していることがわかる。また、Sgx-1を発現する表面外胚葉の近傍に眼杯の陥入が生じていた。Sgx-1の網膜形成における役割は水晶体誘導と同様に非細胞自律的であり、おそらく網膜の分化と形態形成の誘導シグナルを制御していると考えられる。眼杯と水晶体が共に異所的に形成されるが、場合によっては、異所的に陥入した近傍に水晶体が形成されていないことが多く、また幾つかの例では眼杯の形成は正常で、水晶体だけが重複していた。Sgx-1による水晶体の重複によって間接的に眼杯の陥入を制御するのではなく、Sgx-1のシグナルは水晶体と眼杯の形成のそれぞれに独立に関与しうるらしい。

ゼブラフィッシュの胚をレチノイン酸で処理することより、眼杯が腹方化し、眼杯が重複が生じることが報告されている(Hyatt et al., 1992)。レチノイン酸で処理したゼブラフィッシュ胚ではpax(b)(ニワトリPax2と相同)の発現が広がっていることが報告されている(Hyatt et al., 1996)。Sgx-1は眼杯の背側の縁で特に強く、レチノイン酸合成に関わる酵素 aldehyde dehydrase (AHD-II)の網膜の背側で強い発現パターン(McCaffery et al., 1992)と類似している。また、異所的に形成され

た結果として眼胞が背腹軸方向に並ぶことが多く、レチノイン酸で重複したゼブラフィッシュ胚の眼胞と似ている。これらの状況証拠から、Sgx-1がレチノイン酸の代謝等に影響を与えることによって眼杯の背腹軸を重複させ、眼杯の重複を引き起こしているという可能性が指摘された。ところが、Sgx-1によって誘導された重複眼杯ではPax2やTbx 5の発現は変化しておらず眼杯全体としての背腹軸性は変化していなかったことから、すくなくともSgx-1が眼胞の背腹軸性を変化させることで、重複した眼杯を誘導しているのではないことが示された。眼柄や脈絡溝の形態には影響を及ぼしていないこともこの考えを支持する。眼杯が重複したにもかかわらず、その背腹軸は全体を通して保たれていることは、眼杯の陥入とは独立に眼杯の背腹軸が決められていることを示唆する。

Sgx-1の表面外胚葉での発現は眼胞の陥入に十分であるが、眼胞でのSgx-1だけでは眼杯の陥入を引き起こすことができない。

水晶体外胚葉を取り除くことによって眼杯が陥入しなくなる一方で、水晶体プラコードで発現するSgx-1を表面外胚葉で異所的に発現することによって、眼杯の陥入が誘導できる。このことから、網膜の分化と陥入の誘導シグナルは水晶体から分泌され、Sgx-1がその発現を制御していると示唆される。しかしながら、Sgx-1は眼胞でも発現しており、眼杯の陥入と密接に関わった発現パターンを示すことから、水晶体プラコードからの誘導シグナルが眼胞でのSgx-1の発現を誘導し、眼胞でSgx-1が陥入と分化の誘導シグナルを発現させる可能性は否定できない。

予定水晶体外胚葉をSgx-1が発現を始める直前(ステージ12)に除去したところ、除去後24時間後(ステージ18)に眼杯側のSgx-1の発現が観察された。このことは眼胞でのSgx-1の発現が水晶体プラコード(またそこで発現するSgx-1)に依存しないことを示している。この胚はステージ18まで発生させても眼杯は陥入しない。このことは眼胞のSgx-1の発現が眼胞そのものの陥入に十分ではないことを示している。その一方で、眼胞でドミナントネガティブとして働くSgx-1を発現させると眼胞が陥入せず、水晶体も分化しないことが示された。このことは

眼胞で発現する Sgx-1 が単独では眼杯の陥入を引き起こせないものの、眼胞の陥入と網膜の分化に何らかの役割を担っていることを示唆する。これまでの眼胞での Sgx-1 の機能に関して、独立した2つの可能性が考えられる。1) 眼胞での Sgx-1 は水晶体からの Sgx-1 のシグナルと協調して眼胞の陥入を引き起こす。2) 眼胞での Sgx-1 は、直接眼胞の形成に働くのではなく、水晶体プラコードの形成を誘導する為に機能しており、水晶体の形成によって間接的に網膜の分化を引き起こす。

これらの可能性は 1) dnSgx-1 を眼胞に導入すると同時に、表面外胚葉側で Sgx-1 を異所発現させる実験で眼胞の陥入を引き起こせるか 2) 水晶体での Sgx-1 の発現が、眼胞を除去することで失われ、代わりに Sgx-1 を導入した発現する網膜色素上皮予定域の組織で回復するか調べることで検証できる。

Sgx-1 の発現調節

眼杯における Sgx-1 の発現は、予定水晶体外胚葉を除去する実験から、水晶体に依存した機構と水晶体に依存しない機構によって制御を受けていることが示唆される。水晶体プラコードを除去しても Sgx-1 は眼胞で発現することから、初期には水晶体(プラコード)に依存しない機構、おそらく眼胞そのものか前脳による誘導によって制御されているのだろう。これまでに筆者と Vogel-H 博士の共同研究によって、FGF-8 は Rx の発現を誘導することが報告されているが、Sgx-1 の発現を異所的に誘導することが明らかになっている。(Vogel-H 博士 et al., 投稿中)。FGF-8 はステージ 12 前後から眼胞腹側で発現しており、眼胞が形成されるステージ 15 前後には眼胞の中央部で強く発現している。FGF-8 に浸したビーズを移植しても、発現が誘導される領域とそうでない領域が存在し、特に眼杯の耳側 (temporal) では FGF-8 を作用させても Sgx-1 は誘導されないことや、ステージ 15 以降、Sgx-1 は眼杯の中央部で相対的に弱いことから (Vogel-H 博士 et al., 投稿中)、FGF-8 以外にも Sgx-1 の発現を制御する分子が存在するはずである。

網膜と水晶体誘導のモデル

ここまでの結果をもとに、初期の眼のパターン形成に関する二段階モデルが

考えられる。

● 眼胞期 (ステージ 12 以前)

ステージ 13 までに、遺伝子発現のレベルで既に眼胞の側方部と近位部に差が生じる。おそらく眼胞そのものや前脳による正の調節誘導や間充織からの抑制(網膜色素上皮の誘導)によって決まると考えられている。FGF-8 は眼胞の腹側方や前脳の前部末端で発現しており、Sgx-1 や Rx の発現を誘導することから、FGF-8 が網膜分化のイニシエーターである可能性が高い (Vogel-Höpker et al., 投稿中)。そのようにして生じた Sgx-1 の発現とその下流のシグナルが、時期的に見ても、水晶体の特異化のシグナルであるのかもしれない(図 26A)。ただし、この時期に生じた遠近位軸性はそれ自身では安定に保たれず、次に述べるようにステージ 12 以降に水晶体によって維持される。

● 眼杯期 (ステージ 13 以降)

それまでは遺伝子発現のレベルにとどまり、形態的な遠近位方向の極性は見られないが、これ以降眼杯眼胞のステージ 13 以降の眼胞では遺伝子発現の極性同様、組織学的な眼胞(眼杯)の遠近位軸が顕著になる。水晶体プラコードは遠近位軸性の維持と形態的な軸性の発現にとって必要であることが本研究によって明らかになった。水晶体で発現する Sgx-1 が眼杯の陥入と分化の誘導を制御しているのだらうと考えられる。Sgx-1 そのものは核内で働く転写因子であり、Sgx-1 は何らかの細胞外接着因子、細胞外シグナル伝達分子の発現を制御しているのだらう(図 26B)。

現時点で判っていないこと：シグナルの由来と行き先

ここまでの結果から、眼杯の陥入に水晶体プラコードでの Sgx-1 が重要な役割を担うことが明らかになった。眼胞側で Sgx-1 が発現しても眼杯は陥入せず、眼胞側の Sgx-1 は眼杯の陥入と分化に十分ではない。眼胞で Sgx-1 が発現することが眼杯の形成に直接必要なのか、それとも眼胞での発現は水晶体プラコードを形成するために必要なのかは、これまでのデータでは示すことができない。ドミナントネガティブ Sgx-1 を眼胞で発現させた上で、正常胚の水晶体プラコードを移

A 初期 (眼胞期)

B 中期 (眼杯期)

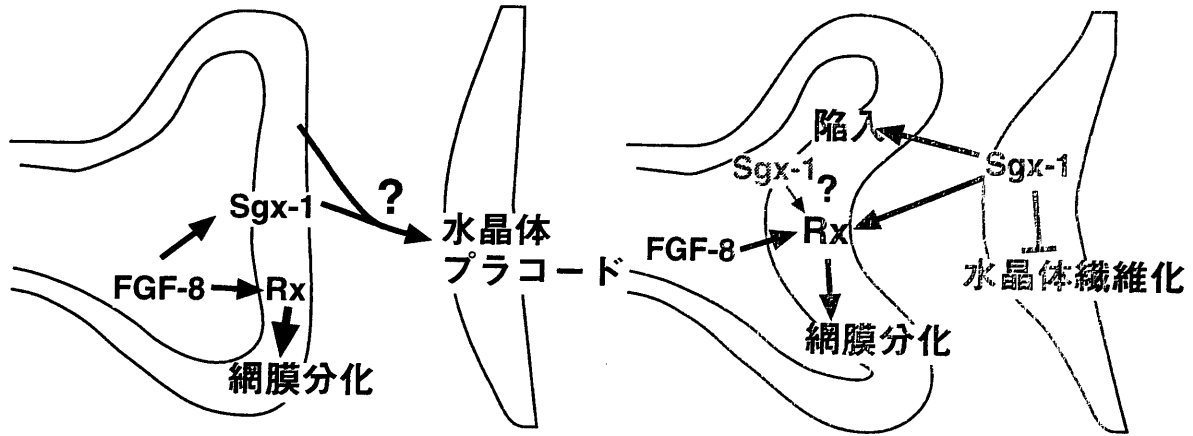


図 26 Sgx-1 の発現誘導と形態形成のカスケードの二段階モデル。A) 初期には (おそらく FGF-8 によって) 眼胞での Sgx-1 の発現が誘導され、眼胞の遠近位軸が生じる。眼胞からのシグナルによって、予定水晶体外胚葉から、水晶体に分化する領域が決まる。(Sgx-1 によって制御されるシグナルがその候補である)。B) Sgx-1 によって制御される水晶体プラコードからのシグナルによって、眼杯の陥入と網膜の分化が進行する。眼杯での Sgx-1 シグナルが、それ自身の陥入を維持する可能性もある。

植する実験を行うことで明らかに出来るかもしれない。

より直接的には、Sgx-1の下流因子を同定し、それらがどこで発現しているか調べることで明らかにできると期待される。aFGFが網膜分化を誘導することが示唆されているが、aFGFは表面外胚葉では水晶体プラコードを含め広い領域で発現している点でSgx-1の発現とは異なり、Sgx-1によって直接制御されているとは考えにくい。また機能の上でも、Sgx-1は眼杯の陥入、網膜の分化を含めた眼杯のパターンを形成するのに対し、aFGFは眼杯の陥入は引き起こさず、神経性網膜への分化だけを誘導することが知られ(Hyer et al., 1998; 及び筆者未発表データ)、その活性は異なる。部分的にオーバーラップした機能と発現パターンからは、FGFが複数存在するSgx-1の標的の一つであるか間接的にSgx-1がFGFの活性を制御する可能性が示唆される。一方水晶体分化に関しても、Sgx-1はFGFとは異なり、水晶体の繊維化を(細胞自律的ではあるが)抑制した。また通常FGF(すくなくともFGF-1,2,8)では神経性網膜の分化を誘導できても、眼杯の陥入は引き起こせないが、Sgx-1は眼杯の陥入という形態的な変化を引き起こすことができるなど、水晶体分化に関してもFGF以外にSgx-1に下流のシグナル伝達分子が存在すると仮定しないと説明できない。

現在考えられているSgx-1シグナルを媒介する分子の候補としては1)Notchまたはそのリガンド。2)cadherin等の接着因子が挙げられている。Notch-1が両生類胚の眼杯のciliary marginで発現することが報告されており(Papalopulu and Kintner, 1996)、これはSgx-1の発現によく似ている。またcNotch-1とそのリガンドであるSerrate-1の発現は水晶体胞で発現していることが報告されており(Myat et al., 1996)、Sgx-1がNotchを介したシグナルカスケードを制御していると予想される。ただし、現在のところNotchが網膜の初期のパターン形成に関与しているという報告はない。一方、cadherinなどの細胞背着分子の機能を制御している可能性も予想される。Sgx-1を*in vivo*で異所的に発現させると、Sgx-1を発現する細胞同士があつまる傾向が見られ、これはcadherin等のhomophilicな細胞接着分子の発現を制御していることを意味する。実際に水晶体プラコード形成の過程でプラコードにおけるカドヘリンの発現がE-cadherinからN-cadherinへ転換するこ

とが知られており (Hatta et al., 1987)、Sgx-1はこの過程を制御しているのかもしれない。ただし、カドヘリンそのものが水晶体や網膜の分化を制御しているとは考えにくく、カドヘリンは複数ある標的の一つにすぎないのかもしれない

水晶体での Sgx-1 の発現が、眼胞に依存して誘導されるのかという点も、網膜、水晶体誘導を考える上で重要である。Sgx-1 の水晶体での発現は比較的 Pax-6 と類似しており、眼胞からの誘導に非依存的に水晶体プラコードで発現するのかもしれない。これに関しては、神経板後期に予定眼胞領域を取り除く実験をおこなうことで明らかになるだろう。

序論で述べたように、眼の形成を取り巻く誘導のカスケードは、器官形成における誘導の役割とそのメカニズムを明らかにする上で非常によいモデルシステムである。本研究から転写因子である Sgx-1 が感覚器官のパターン形成を時間的、空間的に制御するために機能していることが明らかになってきたが、いまだに眼の誘導シグナルの分子的な実体は解明されていない。Sgx-1 による遺伝子発現調節のカスケードを明らかにすることで、全く新規のシグナル伝達分子の同定も含め、眼における誘導のメカニズムが明らかになっていくと期待される。

謝辞

本研究を行うにあたって、指導教授である安田國雄教授には自由に研究を進めることを許していただいたばかりでなく、多くのご指導、ご援助をいただきました。普通の研究室ではなかなかさせて貰えない、良い体験をしたと思います。荻野肇先生には私が学部学生の頃から、実験のこととかいろいろと教えていただきました。生来頑固な私に我慢強く分子生物学の方法を教えてくださいました。現在京都大学ウイルス研究所の梅園和彦先生は奈良でこの研究を始めたときから多くのご助言、ご指導をくださいました。Ruth T. Yu先生にはディスカッションの相手になっていただいたり、実験法を教えてくださいたりして、随分とお世話になりました。井上邦夫先生にはいろいろとご迷惑をおかけしました。高橋淑子先生は私の指導教官ではないにもかかわらず、論文の指導をはじめ大変お世話になりました。安田研の大学院生の皆さん、ポスドクの利根川さん、小柴さんには同僚としていろいろ助けていただきました。皆さんどうもありがとうございました。

引用文献

Adelmanm, H. B. (1929). Experimental studies on the development of the eye. II. The eye-forming potencies of the median portions of the urodelan neural plate (*Triton teniatus* and *Amblystoma punctatum*). J. Exp. Zool. 54, 291-317.

Bober, E., Baum, C., Braun, T., and Arnold, H. H. (1994). A novel NK-related mouse homeobox gene: expression in central and peripheral nervous structures during embryonic development. Dev. Biol. 162, 288-303.

Boterenbrood, E. C. (1970). Differentiation in small grafts of the median region of the presumptive prosencephalon. .

Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L., and Boncinelli, E. (1998). Expression pattern of *cSix3*, a member of the *Six/sine oculis* family of transcription factors. Mech. Dev. 70, 201-3.

Brandt-Rinkwitz, S., Justus, M., Oldenettel, I., Arnold, H.-H., and Bober, E. (1995). Distinct temporal expression of mouse *Nkx5.1* and *Nkx5.2* homeobox genes during brain and ear development. Mech Dev. 52, 371-381.

Casarosa, S., Andreazzoli, M., Simeone, A., and Barsacchi, G. (1997). *Xrx1*, a novel *Xenopus* homeobox gene expressed during eye and pineal gland development. Mech. Dev. 61, 187-98.

Consigli, S. A., Lyser, K. M., and Joseph-Silverstein, J. (1993). The temporal and spatial expression of basic fibroblast growth factor during ocular development in the chicken. Invest Ophthalmol Vis Sci 34, 559-66.

Corner, M. A. (1963). Development of the brain in *Xenopus laevis* after removal of parts of the neural plate. *J. Exp. Zool.* *153*, 301-311.

Coulmbre, A. J. (1956). The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. *J. Exp. Zool.* *133*, 211-225.

Coulombre, J. L., and Coulombre, A. J. (1965). Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev. Biol.* *12*, 79-92.

de Iongh, R., and McAvoy, J. W. (1992). Distribution of acidic and basic fibroblast growth factors (FGF) in the foetal rat eye: implications for lens development. *Growth Factors* *6*, 159-77.

de Iongh, R., and McAvoy, J. W. (1993). Spatio-temporal distribution of acidic and basic FGF indicates a role for FGF in rat lens morphogenesis. *Dev. Dyn.* *198*, 190-202.

de Iongh, R. U., Lovicu, F. J., Chamberlain, C. G., and McAvoy, J. W. (1997). Differential expression of fibroblast growth factor receptors during rat lens morphogenesis and growth. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *38*, 1688-99.

Deitcher, D. L., Fekete, D. M., and Cepko, C. L. (1994). Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J. Neurosci.* *14*, 486-98.

Dragomirov, N. I. (1937). The influence of the neighboring ectoderm on the organization of the eye rudiment. *Dokl. Akad. nauk* *15*, 61-64.

Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T., and Beachy, P. A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the devel-

oping eye and brain. *Curr. Biol.* 5, 944-55.

Fekete, D. M., and Cepko, C., L. (1993). Replication-competent retroviral vectors encoding alkaline phosphatase reveal spatial restriction of viral gene expression/transduction in the chick embryo. *Mol. and Cell. Biol.* 13, 2604-2613.

Fekete, D. M., and Cepko, C., L. (1993). Retroviral infection coupled with tissue transplantation limits gene transfer in the chicken embryo. *Proc. of Natl. Acad. of Sci., U.S.A.* 90, 2350-2354.

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. M. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes. Dev.* 12, 3764-75.

Grainger, R. M. (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet.* 8, 349-55.

Grainger, R. M., Henry, J. J., and Henderson, R. A. (1988). Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 102, 517-526.

Greenhouse, J. J., Petropoulos, C. J., Crittenden, L. B., and Hughes, S. H. (1988). Helper-independent retrovirus vectors with Rous-associated virus type O long terminal repeats. *J. of Virol.* 62, 4809-4812.

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.

Guillemot, F., and Cepko, C. L. (1992). Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an *in vitro* assay of early retinal development. *Development* 114, 743-54.

Hamburger, V. (1942). *A manual of experimental embryology.*, Revised Edition Edition (Chicago: The University of Chicago Press).

Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88, 49-92.

Hartung, H., Feldman, B., Lovec, H., Coulier, F., Birnbaum, D., and Goldfarb, M. (1997). Murine FGF-12 and FGF-13: expression in embryonic nervous system, connective tissue and heart. *Mech. Dev.* 64, 31-9.

Hatta, K., Puschel, A. W., and Kimmel, C. B. (1994). Midline signaling in the primordium of the zebrafish anterior central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2061-5.

Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H., and Takeichi, M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev. Biol.* 120, 215-27.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-90.

Henry, J. J., and Grainger, R. M. (1990). Early tissue interaction leading to embryonic

lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 141, 149-163.

Henry, J. J., and Grainger, R. M. (1987). Inductive interactions in the spatial and temporal restriction of lens-forming potential in embryonic ectoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 124, 200-214.

Herbrand, H., Guthrie, S., Hadrys, T., Hoffmann, S., Arnold, H. H., Rinkwitz-Brandt, S., and Bober, E. (1998). Two regulatory genes, *cNkx5-1* and *cPax2*, show different responses to local signals during otic placode and vesicle formation in the chick embryo. *Development* 125, 645-54.

Hogan, B., Costantini, F., and Lacy, E. (1986). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual., C. S. H. Lab., ed.

Hughes, S. H., Greenhouse, J. J., Petropoulos, C. J., and Sutrove, P. (1987). Adaptor plasmid simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *Journal of Virology* 61, 3004-3012.

Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Drager, U. C., and Dowling, J. E. (1996). Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* 122, 195-204.

Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Marsh-Armstrong, N. R., and Dowling, J. E. (1992). Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8293-7.

Hyer, J., Mima, T., and Mikawa, T. (1998). FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* 125, 869-77.

Inouye, S., Ogawa, H., Yasuda, K., Umesono, K., and Tsuji, F. I. (1997). A bacterial cloning vector using a mutated *Aequorea* green fluorescent protein as an indicator. *Gene* 189, 159-162.

Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer. Res.* 60, 1-41.

Kakizuka, A., Yu, R. T., Evans, R. M., and Umesono, K. (1993). cDNA library construction. In *Essential Developmental Biology*, C. D. Stern and P. W. H. Holland, eds. (Oxford: IRL press), pp. 257-274.

Kang, T., Martins, T., and Sadowski, I. (1993). Wild type GAL4 binds cooperatively to the GAL1-10 UASG *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268, 9629-35.

Kontges, G., and Lumsden, A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122, 3229-42.

Le Douarin, N. M. (1973). A biological cell labelling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.* 30, 217-222.

Leber, S. M., Yamagata, M., and Sanes, J. R. (1996). Gene transfer using replication-defective retroviral and adenoviral vectors. *Methods Cell Biol.* 51, 161-184.

Lewis, W. H. (1904). Experimental studies on the development of the eye in Amphibia. I. On the origin of the lens, *Rana palustris*. *Amer. J. Anat.* 3, 505-536.

Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., and Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development*

124, 603-15.

Li, H. S., Yang, J. M., Jacobson, R. D., Pasko, D., and Sundin, O. (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev. Biol.* 162, 181-94.

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.

Lopashov, G. V., and Stroeve, O. G. (1964). *Development of the Eye. Experimental Studies.* (Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations).

Lopashov, G. V., and Stroeve, O. G. (1961). Morphogenesis of the vertebrate eye. *Adv. Morphol.* 1, 331-377.

Lovicu, F. J., de Iongh, R. U., and McAvoy, J. W. (1997). Expression of FGF-1 and FGF-2 mRNA during lens morphogenesis, differentiation and growth. *Curr. Eye Res.* 16, 222-30.

Lovicu, F. J., and McAvoy, J. W. (1993). Localization of acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and heparan sulphate proteoglycan in rat lens: implications for lens polarity and growth patterns. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 3355-65.

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.

Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A., and Jamrich, M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-607.

McCaffery, P., Lee, M. O., Wagner, M. A., Sladek, N. E., and Drager, U. C. (1992). Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development* 115, 371-82.

McWhirter, J. R., Goulding, M., Weiner, J. A., Chun, J., and Murre, C. (1997). A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development* 124, 3221-32.

Melton, D. A. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acid Res.* 12, 7035-7056.

Mikami, Y. (1939). Reciprocal transformations of the parts in the developing eye-vesicle, with special reference to the inductive influence of lens-ectoderm on the retinal differentiation. *Zool. Mag. (Japan)* 51, 253-256.

Mochii, M., Mazaki, Y., Mizuno, N., Hayashi, H., and Eguchi, G. (1998). Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev. Biol.* 193, 47-62.

Morgan, B. A., and Fekete, D. M. (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol.* 51, 185-218.

Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y., and Okumura, J.-i. (1997a). Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos *in*

ovo. Biochem. Biophys. Res. Comm. 230, 376-380.

Muramatsu, T., Mizutani, Y., and Okumura, J.-i. (1996). Live detection of the firefly luciferase gene expression by bioluminescence in incubating chicken embryo. Animal Science Technology (Japan) 67, 906-909.

Muramatsu, T., Nakamura, A., and Park, H.-M. (1998). *In vivo* electroporation: A powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (review). Int. J. Mol. Med. 1, 55-62.

Muramatsu, T., Shibata, O., Ryoki, S., Ohmori, Y., and Okumura, J. (1997b). Foreign gene expression in the mouse testis by localized *in vivo* gene transfer. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 233, 45-49.

Myat, A., Henrique, D., Ish Horowicz, D., and Lewis, J. (1996). A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. Dev. Biol. 174, 233-247.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. 1, 841-845.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-199.

Ochiai, H., Park, H. H., Nakamura, A., Sasaki, R., Okumura, J. I., and Muramatsu, T. (1998). Synthesis of human erythropoietin *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. Poult. Sci. 77, 299-302.

Ogawa, H., Inouye, S., Tsuji, F. I., Yasuda, K., and Umesono, K. (1995). Localization, trafficking, and temperature-dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc. of Natl. Acad. of Sci., U.S.A.* 92, 11899-11903.

Ogawa, H., and Umesono, K. (1998). Intracellular localization and transcriptional activation by the human glucocorticoid receptor-green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 303-308.

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998a). 日本発生生物学会第31回大会 (熊本).

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998b). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 280, 115-8.

Ohuchi, H., Koyama, E., Myokai, F., Nohno, T., Shiraga, F., Matsuo, T., Matsuo, N., Taniguchi, S., and Noji, S. (1994). Expression patterns of two fibroblast growth factor receptor genes during early chick eye development. *Exp. Eye Res.* 58, 649-58.

Ohuchi, H., Takeuchi, J., Yoshioka, H., Ishimaru, Y., Ogura, K., Takahashi, N., Ogura, T., and Noji, S. (1998). Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick *Tbx5* and *Tbx4*. *Development* 125, 51-60.

Okada, K., Nagata, T., and Takebe, I. (1986). Introduction of functional RNA into plant protoplast by electroporation. *Plant and Cell Physiol.* 27, 619-626.

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.

Papalopulu, N., and Kintner, C. (1996). A *Xenopus* gene, Xbr-1, defines a novel class of homeobox genes and is expressed in the dorsal ciliary margin of the eye. *Dev. Biol.* *174*, 104-114.

Park, C. M., and Hollenberg, M. J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev. Biol.* *134*, 201-5.

Park, C. M., and Hollenberg, M. J. (1991). Induction of retinal regeneration *in vivo* by growth factors. *Dev. Biol.* *148*, 322-33.

Petropoulos, C. J., and Hughes, S., H. (1991). Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *J. of Virol.* *65*, 3728-3737.

Pittack, C., Grunwald, G. B., and Reh, T. A. (1997). Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* *124*, 805-16.

Pittack, C., Jones, M., and Reh, T. A. (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* *113*, 577-88.

Potter, H., Weir, L., and Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. of Natl. Acad. of Sci., U.S.A.* *81*, 7161-7165.

Rebagliati, M. R., Toyama, R., Haffter, P., and Dawid, I. B. (1998). *cyclops* encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 9932-7.

Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an un-

usually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-4.

Sadowski, I., and Ptashne, M. (1989). A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 17, 7539.

Sakagami, K. (1999). 眼形成における Rx の機能解析, 奈良先端大修士論文

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sampath, K., Rubinstein, A. L., Cheng, A. M., Liang, J. O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M. E., and Wright, C. V. (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires *cyclops/nodal* signalling. *Nature* 395, 185-9.

Sawada, K., Agata, K., Yoshiki, A., and Eguchi, G. (1993). A set of anti-crystallin monoclonal antibodies for detecting lens specificities: beta-crystallin as a specific marker for detecting lentoidogenesis in cultures of chicken lens epithelial cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* 37, 355-68.

Selleck, M. A., and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121, 525-38.

Selleck, M. A. J. (1996). Culture and microsurgical manipulation of the early avian embryo. *Methods Cell Biol.* 51, 1-21.

Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain (see comments). *Nature* 358, 687-90.

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735-47.

Smith, S. T., and Jaynes, J. B. (1996). A conserved region of engrailed, shared among all *en-*, *gsc-*, *Nk1-*, *Nk2-* and *msh-* class homeoproteins, mediates active transcriptional repression *in vivo*. *Development* 122, 3141-50.

Spemann, H. (1938). *Embryonic Development and Induction* (New Haven: Yale University Press).

Spemann, H. (1901). Über Korrelationen in die Entwicklung des Auges. *Verh. Anat. Ges.* 15, 61-79.

Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In *Foundations of Experimental Embryology*, B. H. Willier and J. M. Oppenheimer, eds. (New York, pp. 144-184.

Stern, C. D. (1993). Avian embryos. In *Essential Developmental Biology*, C. D. Stern and P. W. H. Holland, eds. (Oxford: IRL Press), pp. 45-54.

Suzuki, T., Shin, B. C., Fujikura, K., Matsuzaki, T., and Takeda, K. (1998). Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Letter* 425, 436-440.

Tachibana, A. (1999). FGF 及びその受容体のニワトリ初期胚の眼における発現, 奈良先端大修士論文).

Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K., and Ogura, T. (in press). *Tbx5*.

Varmus, H., and Brown, P. (1989). Retroviruses. In *Mobile DNA*, D. E. Berg and M. M. Howe, eds. (Washington, DC.: Am. Soc. Microbiol.), pp. 53-108.

Vogel-Höpker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., and Rapaport, D. H. (submitted). Multiple Functions of FGF-8 in Chick Eye Development.

Walther, C., and Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* *113*, 1435-49.

Wang, G. V., Dolecki, G. J., Carlos, R., and Humphreys, T. (1990). Characterization and expression of two sea urchin homeobox gene sequences. *Dev. Genet.* *11*, 77-87.

Whitecomb, J. M., and Hughes, S. H. (1992). Retroviral reverse transcription and integration: Progress and problems. *Annu. Rev. Cell Biol.* *8*, 255-306.

Wilke, T. A., Gubbels, S., Schwartz, J., and Richman, J. M. (1997). Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face. *Dev. Dyn.* *210*, 41-52.

Wilkinson, J. L., and Hodos, W. (1991). Intraocular pressure and eye enlargement in chicks. *Curr. Eye Res.* *10*, 163-8.