

ニワトリ *Dach1* 遺伝子による組織構築の解明

木田 泰之

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

(安田 國雄 教授)

平成 17年 7月 20日

目次

要旨	3
序論	5
第1部 <i>Dachshund</i> 遺伝子の機能解析	
分子機能	
序	6
結果	8
考察	18
肢芽形成	
序	20
結果	22
考察	33
神経管発生	
序	37
結果	41
考察	47
第2部 <i>Daam</i> 遺伝子による平面内細胞極性から見た神経組織発生	
序	51
結果	52
考察	60
総括	63
材料と方法	64
参考文献	70
謝辞	83

要旨

規則正しい立方体や長方体からなる積み木とは異なる我々の組織や器官。複雑怪奇な3次元構築物である組織、器官はどのように形成されていくのであろうか。本研究では、転写、シグナル伝達、そして軸形成の観点から、組織における領域決定の未解明な部分へと、分泌因子から転写まで、分子生物学的手法を用いて、総合的にアプローチすることを目標としている。

四肢形成をモデルとした軸形成、領域決定機構の解明

脊椎動物の四肢は、その原基となる肢芽領域から発生する。肢芽領域から発生した四肢は体幹部から手先へと向かう遠近軸、体軸に沿った前後軸、背腹軸の3方向に正確に発達する。そのうち遠近軸に沿った肢芽発生は、その最も先端に存在する上皮、AER (Apical ectodermal ridge) からのオーガナイジングシグナルにより制御されていると考えられている。さらにAER自身は、直下の間充織からのAEMF (apical ectodermal maintenance factor) により形成、維持されている。現在までに、間充織 AEMF とは何かという議論が盛んに行われているがいまだ決着をみない。筆者は、AEMF 解明のヒントがハエにあると考えた。節足動物であるハエの脚は、遠近軸に沿って的確な節で分けられている。また、節の一部分のみが欠失する変異体がいくつも得られており、その遺伝子の同定も進んでいる。筆者は、遠近軸中間領域のみの欠損というユニークな表現型を示す *Dachshund (Dac)* に着目し、そのニワトリ相同分子 *Dach1* を単離した。我々が単離した *Dach1* は、肢芽発生の初期段階から強く間充織に発現していた。しかしながら、ハエ *Dac* においてさえ分子機能はほとんど解明されておらず、肢芽においての機能に先んじて細胞内機能を明らかにすることが重要であると考えた。

核蛋白である *Dach1* の発現様式は BMP の発現様式の近傍、またハエにおいて *Dac* は BMP の相同分子である *Dpp* の発現領域の近傍に見られる。このことから BMP シグナルに対する *Dach1* の関与が推測され、免疫沈降法、BMP シグナル標的遺伝子である *Xvent2* の転写制御領域を用いたレポーターアッセイにより、*Dach1* が BMP シグナルでの転写活性を負に制御することを見出した。その分子機構は、*Dach1* が BMP シグナル下流転写因子である *Smad1* と結合し、*mSin3A*, *HDAC1* などのコリプレッサー複合体をリクルートし、*Smad* を介する BMP シグナル標的遺伝子の転写活性を抑制することであった。

それでは、BMP シグナルの抑制がどのように肢芽遠近軸形成にかかわっているのか。*Dach1* 機能欠失型を肢芽領域に強制発現させた場合、間充織において *Fgf-10*, *Wnt-5a* などの発現低下がみられ、その結果 AER 形成不全が認められ、完全な四肢遠位領域の欠損が起こった。このことは、*Dach1* が、古くから予想されてきた AEMF の一つであることを示唆している。*Dach1* は AER 自身にも発現することを考え合わせると、今回の

結果は同時に、AER 自身において AER を維持するという新しい概念を生み出した。

では、遠近軸決定はどのようなメカニズムであろうか。近位部領域に、BMP ビーズ移植を行うと、近位部決定因子 *Meis-2* の発現低下が見られた。その分子メカニズムはどのようなものであろうか。その解明のため、VP16 転写活性化ドメインを融合させた *Dach1* (*VP16=Dach1*) を間充織に強制発現したところ、*Meis-2* の発現上昇が見られた。また、*Dach1* 機能欠失型を間充織に強制発現させ、その部位に BMP ビーズを移植すると、BMP による *Meis-2* の発現低下が、*Dach1* 機能欠失型によりキャンセルされた。また、*MEIS* ゲノム転写制御領域を用いたレポーターアッセイを行うと、その活性は BMP により抑制され、*VP16=Dach1* で強く活性化され、*Dach1* 機能欠失型により BMP の *Meis-2* 抑制はキャンセルされた。

以上より、四肢遠近軸形成は遠位部からの BMP シグナルを *Dach1* が抑制することで、AER の形成を維持し、また、*Dach1* が近位部での *Meis-2* の発現を、*Dach1*/*Smad1*/*mSin3A*/*HDAC1* 複合体を介して抑制することにより、反 - 遠位部領域を決定していることが明らかとなった。

本審査では肢芽形成をモデルとした器官形成を中心に、包括的に議論したい。

序論

コンピュータグラフィック、いわゆる CG 技術が進んだ昨今、想像上の物体、生物の描写のみならず、現存する「物」すべてを正確に表すことが可能になっている。特に生物に関しては、その形、色、予想される機能までもが CG で表現され、あたかも本物のようにみせることが可能である。このような CG 技術には、細かな観察が不可欠である。生物の形作りの理解も同様で、注意深く、こと細かに観察することから始まった。生物を観察すると多種多様な形をもっているのがわかる。では、このような形はどのようにしてつくりあげられていくのであろうか。

古代では、受精後母胎の中で液状のものが固まり、それに固形物である骨と筋が加わり、さらに皮と肉で覆われた胎児が、息（霊）を与えられて命ある人間になると考えた。中世においては、すでに受精卵の中に小さな人間があり、それが大きくなって生まれると考えられていた。中世以降、怪我、病気に対する本格的な手術が行われるようになり、同時に胎児の発生についての知識を得る機会が増え、観察という見る行為が大いに貢献した。19 世紀以降には観察するための光学技術の革新に加え、化学的、あるいは外科的な実験が加えられ、発生学の分野は「実験発生生物学」と呼ばれるようになり、組織、器官、生物の成り立ちを理解することに貢献してきた。そして 21 世紀をむかえ、組織、器官の成り立ちを再生につなげていくことに少なからず成功してきた。

今、発生学の主流は遺伝子を通して生物を見ており、遺伝子機能を利用して実験を行っている。その遺伝学の最先端をいくハエを用いた研究は、進化的にあたらしい脊椎動物に大いに貢献する知識を与えており、その遺伝学の有用性から、逆に人間の病気遺伝子の原因機能を探るといふ発想までも生み出しているほどである。

このような最先端のハエの知識を利用し、ホモログハンティング（ハエに存在する遺伝子に類似した遺伝子群を他の生物で取得すること）により脊椎動物にて、多くの発生や病因解明に有用な多くの遺伝子がクローニングされている。代表的なホメオボックス型転写因子群においては、そのゲノム構造までも保存されており、体を形作る基本メカニズムは様々な動植物において同様であることがわかってきた。

本研究において、筆者は組織構築の基本原則を解明すべく、体に対して付属器官である足に注目し研究を行った。結果、得られた知見は、後述する神経発生にも繋がり、さらにはハエにも新たな知見を与えるという結果になったと自負している。本論文では、生物発生の基本原則としての器官発生について、総合的に議論したい。そのため、1．分子機能、2．四肢形成、3．神経発生の順に話を進め、最後に、ハエで提唱された平面内細胞極性という観点から、神経発生を考えた総合的な議論をしたい。

第1部

Dachshund 遺伝子の機能解析

分子機能

序

多細胞生物は、1つの受精卵をその生命の起源とする。受精卵は分裂を繰り返し、新たに生まれた子孫細胞は増殖や分化を経て特殊化した組織を構築する。この緻密で劇的な生命現象は、細胞が時間的・空間的に正しく規定された調節を受け、適切な遺伝子を発現することを必要とする。現在までに、細胞接着因子や細胞増殖因子、または転写調節因子が、形態形成に直接、深く関与していることが多数報告されている。しかし、多くの分子について、その機能および相互作用の詳細は明らかにされていない。秩序だった発生過程を、さまざまな分子の機能、相互作用に基づいて理解することが、さまざまな組織、器官の発生を知るのみならず、成体における再生過程の理解にもつながる。

細胞増殖因子は、発生期の様々な時期、場所において最も重要な働きをしている。これらは、組織、器官形成の初期において重要な働きをすることから、誘導因子と呼ばれ、その多くは分泌性誘導因子である。組織は、様々な誘導因子の量、質の違いによりそれぞれの個性を獲得している。しかしながら、これら誘導因子の量、質の違いを個々の細胞がどのように判別し、その標的遺伝子の発現を誘導するのか未だ解明されていない。

この複雑な誘導因子からシグナルの解明において、ハエの複眼原基が良いモデルとなっている。ハエの複眼原基において、hedgehog、Decapentaplegic (*Dpp*)、Epidermal growth factor (EGF) などの様々な誘導因子が作用している。しかしながら、これら一つでも欠失すると正常な複眼は形成されない (Ferguson and Anderson, 1992, Clifford and Schupbach, 1989)。

ハエ複眼形成は、複眼原基における正常な形態形成溝の構築に由来している。*Dpp*の発現する形態形成溝は複眼原基において、尾側から吻側に移動し、この形態形成溝の通過にともない、複眼神経細胞は分化し、視神経細胞へと成熟する (Heberlein et al., 1993)。ハエ *Dac* は複眼において EGF シグナルの変異を回復する変異体として得られた。*Dac* は複眼原基において、視神経細胞の分化に必要な現象である形態形成溝とその前後付近に発現している。また、*Dac* の変異体では、形態形成溝の移動が起らず、視神経細胞の分化の停止、遅延が見られる (Mardon et al., 1994)。

一方、*Dac* は複眼以外に、脚中間部分の欠失が見られる (Mardon et al., 1994)。ハエの脚原基は、将来遠位部となる領域に *Dpp* と *Wingless* が発現し、それら誘導因子は近位部へと濃度勾配を作っている (Couso and Bishop, 1998)。*Dac* は遠近部の中

間部に発現しており、*Dac*の変異により脚中間部分のみ欠失する。その結果、短い脚となり、この結果、ダックスフンドという名がつけられた。

このように *Dachshund* は、様々な組織、器官において重要な働きをしていることが示唆される核蛋白である。しかし、DNA 結合部分や核移行シグナルが見つからないためその分子機能が不明のままであった。

現在までに、*Dac*の相同分子としてマウス、ヒト、ニワトリでそれぞれ報告されている (Hammond et al., 1999, Heanue et al., 1999, Caubit et al., 1999)。これらの相同分子間には、保存された領域を N 末側と C 末側に持つ。C 末側の保存領域は -helical coiled coil domain を有している (Hammond et al., 1998)。-helical coiled coil domain は多くのシグナル分子や転写制御因子に見られ、蛋白間の結合に使用される (Atkinson and Stewart, 1991)。実際、*Dac* やニワトリ *Dachshund2* はこの -helical coiled coil domain を用いて、eyes absent (*eya*) やそのニワトリホモログである *Eya2* と結合する (Chen et al., 1997, Heanue et al., 1999)。ハエ *eya* は *Dac* と同様に複眼原基に発現しており、その変異体は形態形成溝に異常が生じることから、*Dac* と遺伝的相関性が予想され、*Dac/eya* の結合が確認された。しかしながら、*eya* も *Dac* と同様に DNA 結合部分と核移行シグナルを持たず、機能は不明な部分が多い因子であることから、*Dac/eya* 複合体の機能は未だ解明されていない。

複眼原基では形態形成溝の形成に *Dpp* がきわめて重要であり、また、脚原基においても *Dpp* シグナルの欠失により脚で変異が生じる (Ferguson and Anderson, 1992)。*Dac* の変異体において、複眼原基、脚原基に異常が生じることから、*Dac* と *Dpp* の関係に注目し、そして脊椎動物での *Dac* の機能解析を行った。

脊椎動物において *Dpp* 相同分子である BMP (bone morphogenetic protein) は、発生過程の様々な組織、器官において様々な機能が報告されている (De Caestecker and Meyrick, 2001, Wotton and Massague, 2001)。TGF スーパーファミリーである BMP は細胞膜上の BMP 受容体に結合し、受容体の自己リン酸化を経てそのシグナルを細胞内へ伝達する。BMP が結合した受容体は、細胞質に存在する受容体反応型 *Smad* (R-*Smad*: *Smad1*, *Smad5*, *Smad8*) をリン酸化する。リン酸化された R-*Smad* は補助 *Smad* (C-*Smad*: *Smad4*) とヘテロ 2 量体を形成し、核へと移行する。そして、DNA 上の SRE (*Smad* responsive element) に結合し、一般的に転写を活性化する。これは、*Smad* が CBP などの転写活性化因子と結合するためである (Wotton and Massague, 2001) (図 1)。

本研究では、まず脊椎動物においてのニワトリ *Dachshund1* (*Dach1*) と BMP との分子的な相関性を明らかにし、BMP シグナルにおいて *Dach1* がどのように関与しているのか明らかにすることを目的とした。

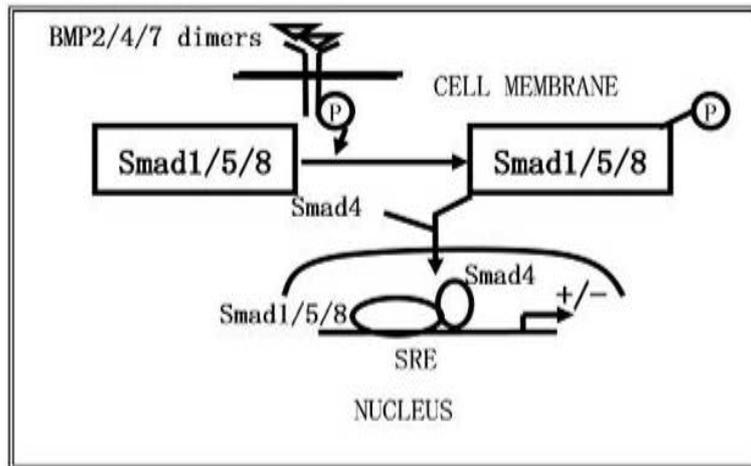


図 1 BMPシグナルは細胞膜受容体を介して、核内へ伝達される。細胞質内でリン酸化された *Smad1/5/8* は *Smad4* と複合体を形成し、核へ移行する。核内において、*Smad* の複合体は SRE に結合し、標的遺伝子の転写を正、負に制御する。

結果

Dachshund は N 末側と C 末側に種間で保存された領域をもつ

Dachshund はハエから哺乳類の相同分子で N 末側と C 末側の 2 つの領域に共通に保存されたドメインを有することがわかっている (Hammond et al., 1999)。ニワトリ相同分子である *Dach1* のアミノ酸をハエ、ヒトと比較した (図 2)。その結果、ニワトリとヒトで 86% の相同性であった。また、ハエとヒトで保存されたドメインをニワトリホモログでも有し、また、C 末側の保存ドメインは α -helical coiled coil domain をもつことを確認した。

Dach1 は核蛋白である

Dachshund は、ハエにおいて核蛋白として知られている (Mardon et al., 1994)。そこで脊椎動物においての *Dach1* の細胞内局在を確認するため、Flag タグ付きの *Dach1* を作製し、Cos7 細胞に遺伝子導入した (図 3A)。Cos7 細胞において、全長 *Dach1* (WT *Dach1*) は、ハエと同様に核に局在が観察された (図 3B 矢印)。しかしながら、一部では核と細胞質の両方に局在が観察された (図 3B 矢頭)。

さらに、*Dach1* の機能を探るため、N 末の保存領域を含む N 末側蛋白 (DD1) と C 末の保存領域を含む C 末側蛋白 (DD2) を作製し、その局在を観察した (図 3B)。DD1 は恒常的に核に存在し、WT *Dach1* で見られた細胞質での存在は見られなかった (図 3B)。逆に、DD2 は、核に局在性を示す場合もあるが、主に細胞質にその局在が観察された (図 3B)。このことから、*Dac* の N 末側には核移行に必要な部分が存在することが考えられた。しかし、既存の核移行シグナルの存在は確認されていない (Mardon et al., 1994)。

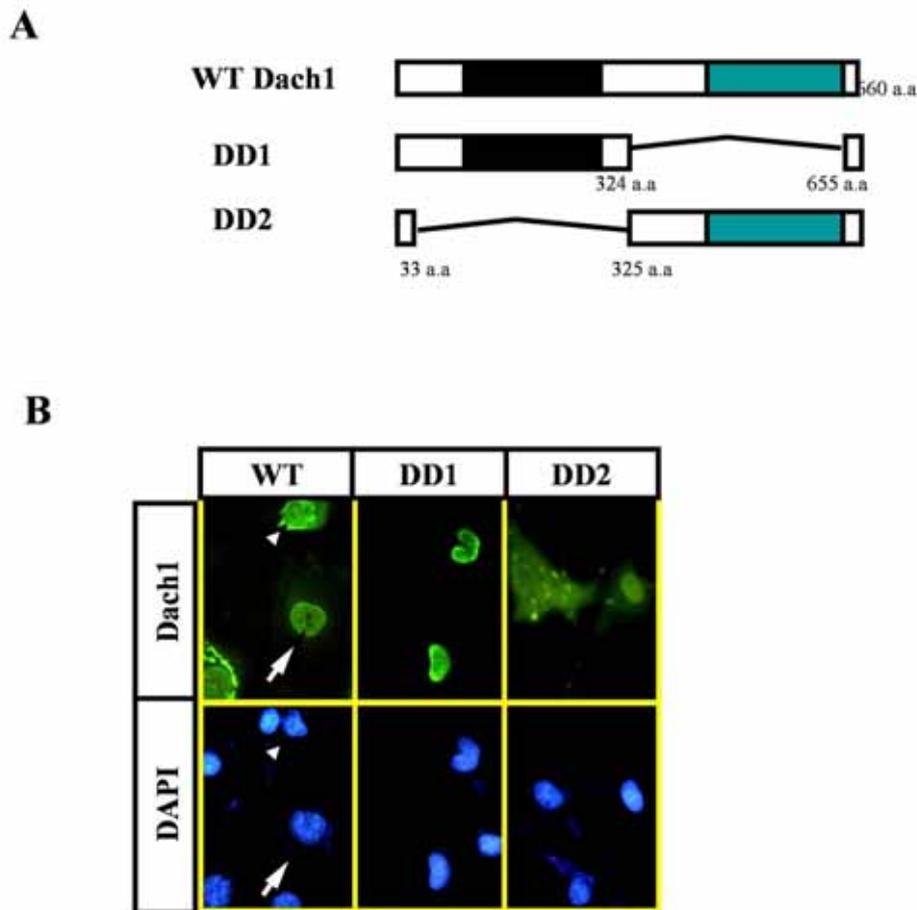


図 3 Cos7細胞における *Dach1* の細胞内局在

(A) *Dach1* の2次元蛋白構造。数字はアミノ酸番号である。(B) Cos7細胞にFlag付 *Dach1*、324-600 a.a (DD1)、1-323 a.a (DD2) *Dach1* を導入し、Flag抗体で染色した。核は、DAPIで青色に染色してある。WildType (WT) *Dach1* は、主に核(矢印)と、すこし細胞質(矢頭)に見られ、DD1は核に、DD2では細胞質への染色が見られるようになった。

Dach1 は BMP シグナルを負に制御する

八工発現様式から BMP シグナルとの関与が推測されていることから、レポーターアッセイを用いてその関与を検討した。レポーター遺伝子はアフリカツメガエルにおいて BMP の直接のターゲットである *Xvent2* の転写制御領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだもの (*Xvent2*-Luc) を使用した。また、このレポーターは哺乳類細胞でも BMP に反応することは示されており、BMP 反応性の C2C12 細胞と BMP 反応性が不明確である Cos7 細胞を用いた (Wang et al., 2000)。

Cos7 細胞にレポーター遺伝子と BMP 遺伝子を共導入したものにそれぞれの *Dach1* を導入した。その結果、BMP4 単独のものを 1 とすると、WT では最も強く約 5 倍の転写抑制が見られた (図 4A)。

また、C2C12 細胞においても同様の結果が得られた (図 4B)。さらに、WT は濃度依存的にその抑制が見られた。一方、DD1、DD2 においては、BMP シグナルの抑制はほとんど見られなかった (図 4B)。今まで BMP に対する反応性が不明確であった Cos7 細胞も BMP に反応し、さらに *Dach1* の抑制が見られることがわかった。したがって、以後の実験には Cos7 細胞と C2C12 細胞を状況に応じて使用した。以上、Cos7、C2C12 細胞を用いた結果から、*Dach1* は何らかの方法で BMP シグナルと抑制することが確認された。

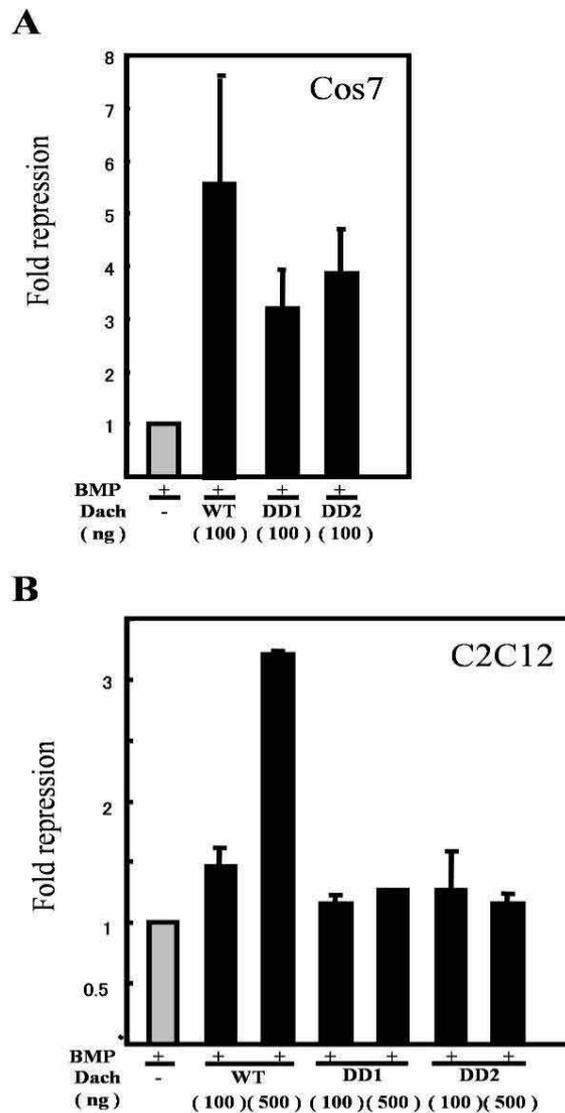


図 4 *Dach1*によるBMPシグナルの抑制

(A,B)Cos7 (A)、C2C12 (B)細胞にそれぞれのコンストラクトを導入し、*Xvent2*転写制御領域にルシフェラーゼを融合したレポーターをしたLucアッセイをおこなった。すべてのWellに100ngの*Bmp-4*発現プラスミドを導入してある条件下においての、抑制をみた。36時間後、ルシフェラーゼ活性と共導入してあったβガラクトシダーゼ活性を測定し、後者はノーマライズに使用した。見せている図は、3回の独立した実験の平均値である全長 *Dach1*は濃度依存的に *Xvent2* - *Luc*を抑制したが、DD1、DD2はCos7のみで抑制が見られ、C2C12さいぼうではほとんど効果がなかった。

次に、詳細に *Dach1* の BMP シグナル抑制メカニズムを解析するため、Gal4 の DNA 結合領域と *Smad1* を融合させた遺伝子を作製した (図 5A)。Gal4 によりレポーター遺伝子の制御領域に運ばれた *Smad1* は転写制御複合体を形成し、レポーター遺伝子を活性化または抑制する (Massague, 1998)。Gal4 融合型の *Smad1* も BMP シグナル依存的にその転写活性をあげることを確認した (図 5B)。ここに、WT、DD1 それぞれの *Dach1* を加えた。その結果、*Xvent2-Luc* と同様に、*Dach1* は *Smad1* の転写活性を抑制した (図 5B)。このことから、*Dach1* が核内において *Smad1* の標的遺伝子を抑制していることを確認した。

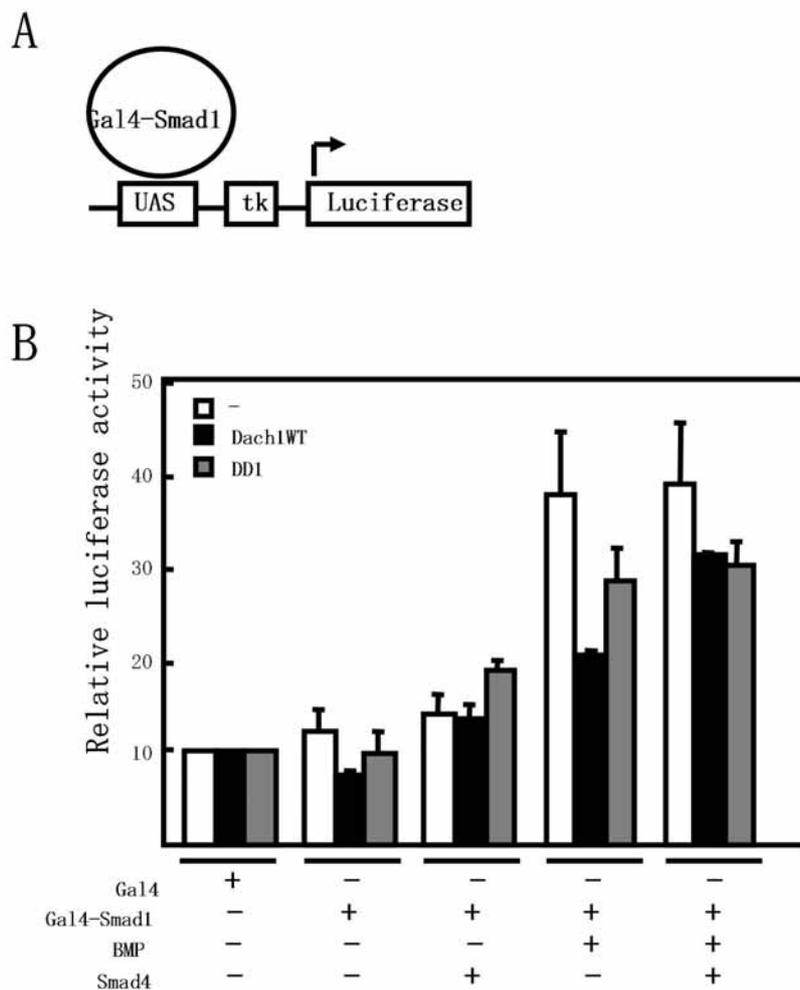


図 5 *Dach1*による *Smad1*シグナルの抑制

(A) Gal4-Luc システムの概略図。 *Smad1* 遺伝子を Gal4 の DNA 結合ドメインを融合させ (Gal4-*Smad1*)、これは UAS サイトに結合し、ルシフェラーゼ遺伝子を制御する。(B) C1C12 細胞に *Dach1* 発現ベクターを導入し、36 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。Gal4 単独の値を 10 にし、比較グラフをあらわしている。BMP に反応した Gal4-*Smad1* の転写活性を全長 *Dach1* は強く抑制した。

Dach1は核内で Smad1 と結合する

Dach1 が BMP 標的遺伝子の転写を抑制することを示した。よって、この転写抑制は *Smad1* と結合することに依存していると推測される。そこで、*Xvent2-Luc* レポーターアッセイに VP16 の転写活性化ドメインを融合した *WT Dach1* (*VP=Dach1*) を添加し、その効果を調べた。50ng の WT で弱く転写抑制が見られ、その状態に *VP=Dach1* を添加すると、*VP=Dach1* は BMP シグナルを活性化した (図 6A)。また、さらに *Smad1* との結合を調べるため、免疫沈降法を用いて確認した。転写因子として作用するためにリン酸化された *Smad1* は核へ移行するため、ここでは、核分画を免疫沈降に用いた。その結果、*Dach1* と *Smad1* は結合していることを確認した (図 6B)。

以上のことから、*Dach1* は細胞核内において BMP 標的遺伝子の転写を抑制する新たな分子であることが明らかになった。

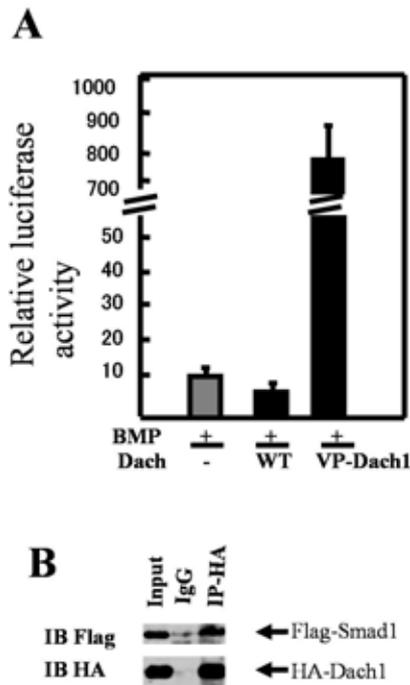


図 6 *Dach1* と *Smad1* との結合

(A) Cos7細胞に *Dach1* と VP16融合 *Dach1* を導入し、36時間後の *Xvent2-Luc* のルシフェラーゼ活性を測定した。BMP4の値を10にセットした。*VP=Dach1* は高い転写活性をしめし、*Xvent2-Luc* をより活性化していた。(B) Cos7細胞にHA融合の *Dach1* とFlag融合の *Smad1* を導入した。Flagにより免疫沈降させて、Flag、HAで染色した。Flag融合型 *Smad1* とHA融合型 *Dach1* が結合しているのが確認できた。IgGはコントロールとして、同細胞液を non-specific IgGで免疫沈降したものである。

Dach1は転写抑制制御因子である

Dach1 の細胞内局在の結果より、*Dach1* は主に核に存在していた (図 3B)。また、ハエでは DNA 結合型転写因子 *so* や *eya* と相互作用することが示されていることから、

ハエ *Dac* は転写に関与する可能性が推測されている (Mardon et al., 1994)。そこで *Dach1* の転写因子としての機能を探るため、Gal4 を用いたレポーターアッセイを行った。*Dach1* に Gal4 の DNA 結合領域を融合させ (Gal4-*Dach1*)、レポーターとして UAS ルシフェラーゼを用いた (図 7A)。

全長 *Dach1* を融合させた Gal4-WT は、レポーター遺伝子の転写を濃度依存的に強く抑制し、また Gal4-DD1 も全長に比べると弱いながら転写抑制が見られた。一方、Gal4-DD2 にも転写抑制が見られた (図 7B)。以上のことから、*Dach1* はある遺伝子の転写に関与し、転写抑制因子として機能することが示唆された。

***Dach1* の転写制御に転写抑制因子群が関与する**

Gal4 を用いたレポーターアッセイにより、*Dach1* が転写抑制因子として機能することが示された。このことから、現在までに知られている転写抑制因子群が *Dach1* の転写抑制に関与する可能性が考えられた。

SMRT 複合体は SMRT が *mSin3A* をその構成要素として含んでいる。*mSin3A* は様々な転写制御因子と結合し、その標的遺伝子を抑制している。また、*mSin3A* はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を結合しており、ヒストンを脱アセチル化することで、クロマチンをヒストンに凝集させ RNA ポリメラーゼが DNA に結合することを妨げている (Kao et al., 2000)。

そこで、Gal4-*Dach1* で見られた転写抑制に SMRT 複合体が関与する可能性から、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤 (トリコスタチン: TSA) を添加した。その結果、Gal4-*Dach1* の転写抑制が緩和された (図 7C)。このことより、*Dach1* の転写抑制に HDAC が関与していることが明らかとなった。さらに、Gal4-*Dach1* に *mSin3A*、HDAC1 を同時に導入し、その効果を見た。その結果、Gal4-*Dach1* の転写抑制が増大した (図 7D)。

転写抑制因子群との結合

Gal4-*Dach1* の転写抑制に SMRT 複合体構成因子構成要素である *mSin3A* と HDAC が深く関与していることを確認した。そこで、*Dach1* が *mSin3A* と結合することでその転写抑制性能を獲得していると考えられる。

そこで、*Dach1* と *mSin3A* との結合を免疫沈降法により確認した。*mSin3A* は *Dach1* 全長と共沈した (図 8A)。また、細胞染色においても *mSin3A* と *Dach1* は核内で共局在が観察された (図 8B) SMRT 複合体は核内で特異的な染色像を示す事が知られている (Kao et al., 2000)。培養細胞の核内において、SMRT 複合体はまばらな、かつ凝集した像 (MADbody) が見られ、その確立は 10-20% である。Gal4-*Dach1* の転写抑制に SMRT 複合体が関していることから、Cos7 細胞での *Dach1* 染色像にも MADbody がみられるのではないかと考えられたので、詳しくその染色像を調べた。その結果、15.4% の染色

された細胞の核で MADbody が確認された (図 8B)。以上より、*Dach1* の転写抑制機能に *mSin3A*, *HDAC1* を含むコリプレッサー複合体が深く関与していることが明らかになった。

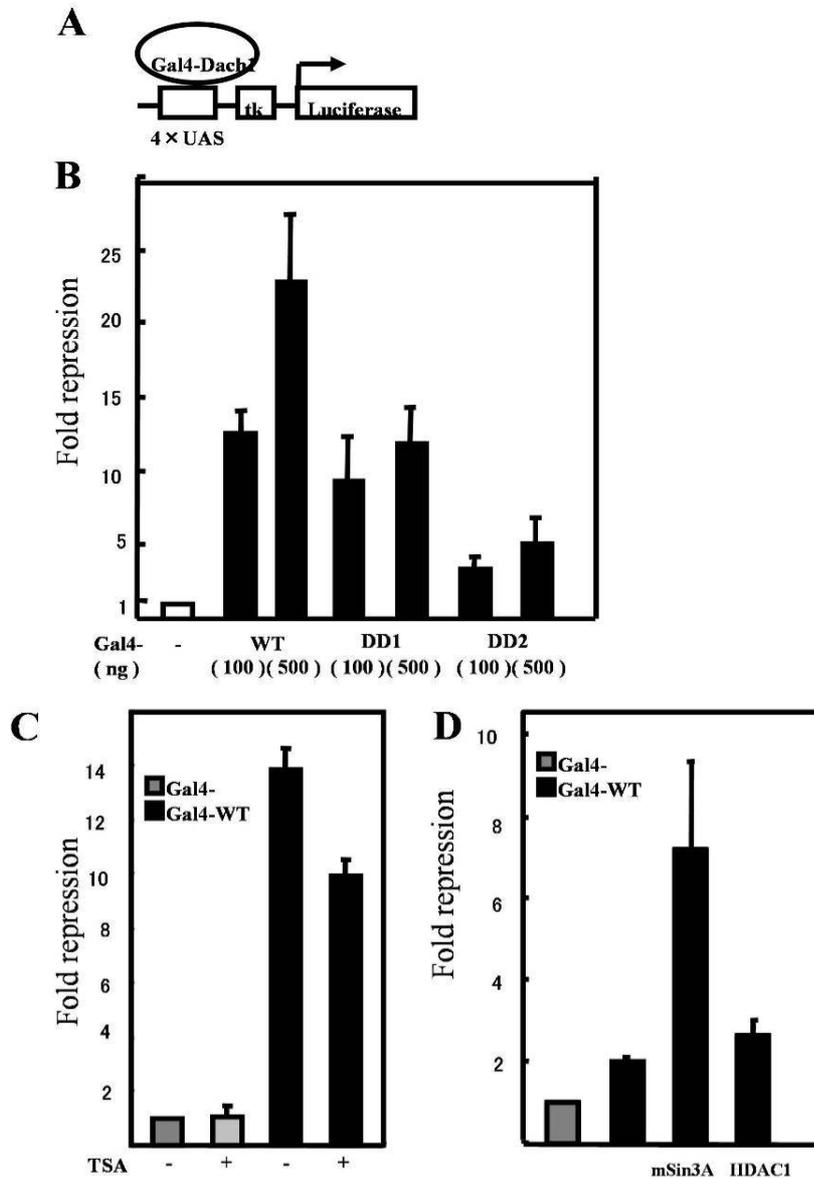


図 7 Gal4-*Dach1*による転写抑制

(A) Gal4-Lucシステムの概略図。様々な*Dach1*遺伝子をGal4のDNA結合ドメインを融合させ、転写能を測定した。(B) 全長 (Gal4-WT)、Gal4-DD1、Gal4-DD2をCos7細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。全長がもっとも強い転写抑制化能を示した。(C) Gal4-WTを導入した細胞に、トリコスタチンA (TSA)を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。TSA処理により、Gal4-WTの転写抑制は、すこし解除された。(C) Gal4-WTに*mSin3A*や*HDAC1*を共導入した。それぞれにおいて、転写抑制化能が上昇した。

Dach1のBMPシグナル抑制はHDACを介する

Dach1 は新規 BMP シグナル抑制因子であることを示した。また、*Dach1* は転写抑制複合体の構成要素となることを示した。そこで、*Dach1* の BMP シグナル抑制が転写抑制複合体によるものかどうかを調べた。*Xvent2-Luc* レポーターに *Dach1* を添加し、さらに *mSin3A* を添加した。その結果、*Dach1* による *Xvent2-Luc* の転写抑制が増大した (図 8C)。以上より、転写抑制複合体を結合した *Dach1* は、*Smad1* と結合することにより BMP 標的遺伝子の転写を抑制する新たな分子であることが明らかとなった。

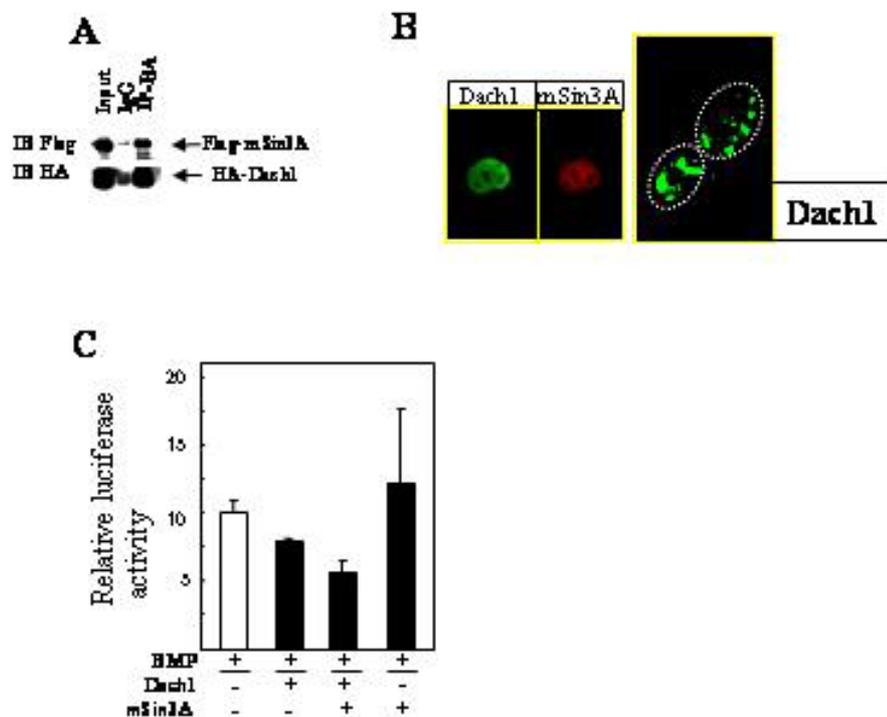


図 8 *Dach1*による転写抑制はmSin3Aを介する

(A) Cos7細胞にHA融合の*Dach1*とFlag融合の*mSin3A*を導入した。Flagにより免疫沈降させて、Flag、HAで染色した。Flag融合型*mSin3A*と*Dach1*が結合したのがわかる。IgGはコントロールである。(B) HA融合型の*Dach1*は核内にてmSin3Aと共局在し、またリプレッサー複合体の示すMADBodyに局在する場合がある。(C) *mSin3A*は、*Dach1*による*Xvent2-Luc*の転写抑制を増強した。

*Dach1*はSmadと協調し、筋分化を抑制する

C2C12細胞を用いた様々な実験より、BMPにより骨細胞へ分化転換する場合、骨特異的遺伝子*osteocalcin*遺伝子の発現を誘導し、筋分化を促進する*myogenin*の発現を抑える必要がある。逆に、筋分化へと向かう場合はMyoDや*Six1/4*により*myogenin*の発現が誘導される (Fan et al., 2000)。したがって、骨、筋肉への分化転換において、*myogenin*は負に、または正に制御される必要がある。実際、*myogenin*の転写制御領域には2つの並んだ*Smad* binding element (SRE)とMyoD、*Six1/4* binding

element (MEF3 element)が存在する。

Dach1 は *Eya3* と結合し、*Six4/Eya3/Dach1* の複合体を形成し、転写活性化因子 CBP をリクルートするという結果がある (川上ら unpublsh date)。よって、おそらくこの複合体は *myogenin* の Six binding element に結合し *myogenin* の転写を活性化し、筋分化を促進すると考えられる。

しかし、本研究では *Smad1* と *Dach1* が結合し、標的遺伝子の転写を抑制することを示した。したがって、BMP シグナルによる骨細胞分化の際、*Smad1* は *Smad4* とヘテロダイマーを形成し、*Dach1* と複合体を形成することにより *myogenin* の発現を抑制していると予想される。

そこで、筋、骨前駆細胞である C2C12 細胞を用い、分化に対する *Smad1*、*Dach1* の影響を見た。C2C12 細胞にタグ付き遺伝子を導入し、3 日間分化誘導した。導入された細胞をタグで染色し、また筋特異的 myosin-heavy chain (MHC) で染色した。結果は、導入された細胞数 (タグで染色陽性の細胞) の内で、MHC 陽性の細胞数の割合を表した。*Smad1* 導入の場合、筋分化が抑制され、*Dach1* も同じ作用がみられた。逆に、*Eya1* を導入すると筋分化が促進された (図 9A)

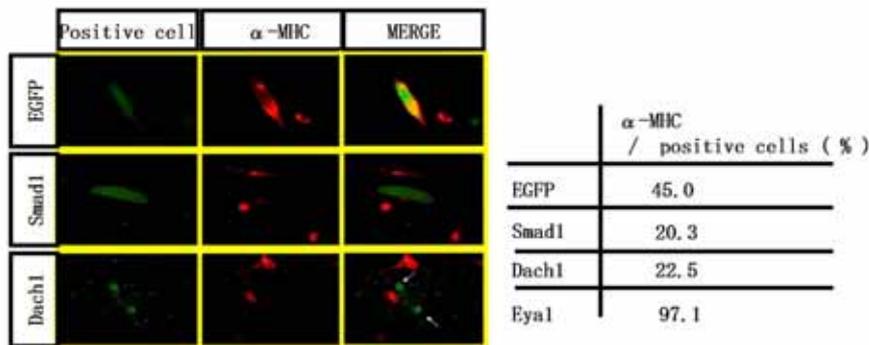


図 9A 筋分化における *Dach1* の影響

Dach1 を導入した細胞を筋細胞へ3日間分化誘導した。*Dach1* 導入細胞は *Smad1* と同様、MHC 陽性の筋肉細胞筋数が減少しており、筋分化が阻害された。逆に、*Eya1* 導入細胞は、ほぼすべてが MHC 陽性の筋肉細胞に分化した。EGFP はコントロールとして用いた。

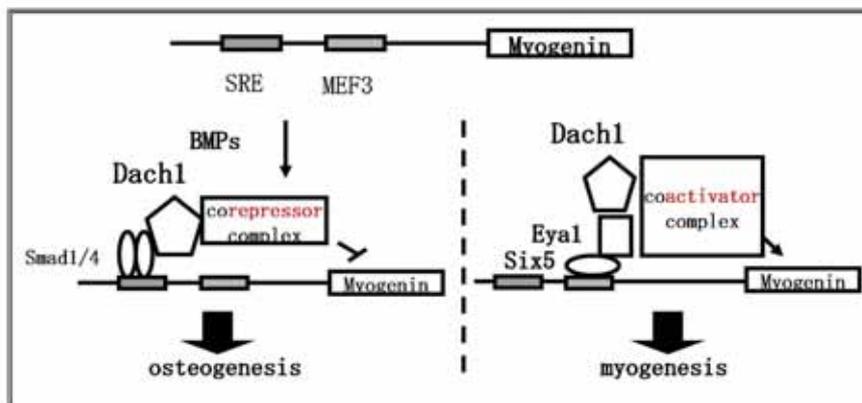


図 9B

筋前駆細胞から骨芽細胞、筋細胞への分化における *Dach1* の関与の可能性

考察

Dach1 は核蛋白である

Dach1 がハエと同様に核蛋白であることを確認した。また、DD1 は恒常的に核への局在が見られたことから、N 末側に核移行シグナルの存在が予想された。しかし、*Dach1* 蛋白には既存の核移行シグナルや核排出シグナルなどは見つからないことから、他の蛋白により核へ移行されることも考えられる。

現在のところ、*Dach2* 結合蛋白としては *Eya2* が知られている (Heanue et al., 1999)。脊椎動物において 4 つの *Eya* 相同分子が確認されているが、*Eya2* は細胞質に存在するがホメオボックス遺伝子 *Six1/4* 依存的に核へ移行することが報告されている (Fan et al., 2000)。したがって、*Eya2* と結合する *Dach2* は *Six4 - Eya2* と複合体を形成し核へ移行する可能性が考えられる。しかしながら、*Dach1* は *Eya2* とは結合しない (川上ら unpublished)。今後、どの *Eya* 相同分子と結合や、*Dach1* の核への局在に *Eya* が関与するかを検討することで、*Dach* や *Eya* の各移行メカニズムが明らかになるだろう。

Dach1 蛋白結合因子として酵母を用いたスクリーニングにより、*Ubc9* が知られている (Machon et al., 2000)。*Ubc9* はユビキチン触媒因子 E2 であり、SUMO1 ユビキチン様蛋白を結合し、E3 非依存的に標的蛋白に SUMO1 を付加する (Sampson et al., 2001)。さらに、*SUMO1* は Ets ファミリーの *Te1* やホメオボックス型転写因子 *Chx10* などのさまざまな転写制御因子に付加され、その核移行を正に制御しているという報告がある (Kurtzman and Schechter, 2001, Chakrabarti et al., 2000)。

Dach1 は新規核内 BMP シグナル抑制因子である

Dach1 は発生期において、中枢神経系、筋肉などで特異的な発現をしている。特に、肢芽領域では BMP4 の発現が一致またはその近傍に見られた。したがって BMP シグナルと関与が考えられたので、レポーターアッセイ等を用いて BMP シグナルとの関係を調べた。その結果、レポーターアッセイや免疫沈降などにより、*Dach1* は *Smad1*, *Smad4* と結合し BMP シグナルでの転写活性を負に制御することを確認した。

BMP シグナルを負に制御するものは *Noggin* をはじめ細胞外分泌因子はよく知られている (Hirsinger et al., 1997, Fainsod et al., 1997)。しかし、核分画での *Smad1* との結合より、*Dach1* は核内において BMP シグナルでの転写活性を負に制御する分子である。現在のところ、細胞内 BMP シグナル抑制因子として知られているものは抑制性 *Smad* (I-*Smad*: *Smad6/7*) などであり、これらは *Smad* がヘテロ 2 量体を形成するのを細胞質で妨げているものである (Wotton and Massague, 2001)。他に、最近報告された *Tob* は細胞内 BMP シグナル抑制因子であるが、その作用は *Smad1* を核外へ移行させるのが主な作用であること、また抑制性 *Smad7* と結合し BMP 受容体の分解を促進

させることで BMP シグナルを抑制することが示された (Yoshida et al., 2000)。したがって、これらは総合的に BMP シグナルを遮断するものであり、この点で分泌型の BMP アンタゴニストと同様な作用をもつ。しかし、*Dach1* は核内 BMP 抑制因子であり、さまざまな BMP シグナルの標的に特異性をもって、作用していると考えられる。

***Dach1* は SMRT 複合体の構成要素である。**

Dach1 の Gal4 融合蛋白を用いたレポーターアッセイより、*Dach1* が転写抑性能を持つことを示した。さらに、その転写抑制が SMRT 複合体の構成要素依存的であることを示し、免疫沈降により細胞内での結合も確認した。このことは、*Dach1* が *in vivo* において SMRT 複合体の構成要素として働いていることを示唆している。SMRT 複合体はさまざまな転写因子と結合しており、DNA 結合型の転写活性を負に制御している。*Dach1* は DNA 結合能を有していないことから、SMRT 複合体を結合した *Dach1* がどのような DNA 結合型転写因子と結合しその標的遺伝子の転写を負に制御しているのかを今後調べる必要があると考えられる。そこで、現在 Two-hybrid 法を用いて、*Dach1* 結合蛋白をスクリーニングしたところ、*Shh* シグナル下流因子 Gli2 が得られた。このことは、*Dach1* は BMP シグナルのみならず、*Shh* シグナルにも関与する可能性が示唆される。

***Dach1* は分化転換に重要な因子である。**

筋分化、骨分化において BMP は重要な働きを持っているが、その分子的な分化転換様式は不明であった。しかし、今回の *Dach1* を用いた結果より、ひとつの可能性が示唆された。BMP シグナルを受けた細胞群は、細胞内で *Smad1* と *Dach1* が複合体を形成し、筋誘導因子群の転写を抑制して、骨分化を誘導する (図 9B)。 *Smad1* は骨特異的アルカリフォスファターゼ遺伝子の転写を活性化するが、*Dach1* を加えても変化が見られなかった (Data not Shown)。よって、*Smad1*/*Dach1* 複合体もその標的遺伝子に特性を持つことが予想される。このことに関して、肢芽形成の結果を踏まえてもう一度考察したい。

肢芽発生

序

ニワトリ肢芽の成り立ち

肢芽の形態形成は、3方向（背腹、前後、遠近）の軸の決定、構築に由来している。背腹軸（DV:Dorsal-Ventral 軸）と前後軸（AP:Anterior-Posterior 軸）と遠近軸（PD:Proximal-Distal 軸）は、それぞれオーガナイジングセンターからの調節を受け、その方向性が決められていく（Johnson and Tabin, 1997; Martin, 1998; Schwabe et al., 1998）。軸決定には多くの遺伝子が関与していることが知られているが、特に *Engrailed-1* (*En-1*) は腹側に、*Wnt-7a* は背側にそれぞれ発現している初期運命決定遺伝子とされており、*En-1* は背側の *Wnt-7a* を、*Wnt-7a* は腹側 *En-1* をお互い抑制しており、また *Wnt-7a* は LIM-ホメオドメイン転写因子 *Lmx1b* を背側間充織に誘導し、*En-1* は間充織においても発現が見られる。つまり、*En-1* と *Wnt-7a* シグナルは上皮、間充織の両方において、明確な背腹境界を形成している（Cygan et al., 1997）。これらの背腹の遺伝子発現境界にて背腹の機能的、構造的差異が生まれ、この境界部に *Notch1*、*Fgf-8* 遺伝子が発現し、外胚葉性頂堤（AER:Apical Ectodermal Ridge）が構築される（Hayashi et al., 1996; Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001）。肢芽における AP 軸の形成は、肢芽後方の間充織の ZPA（Zone of Polarizing Activity）に制御されている。約 40 年前 Sanders らは肢芽の後側間充織を前側に移植すると鏡像対称の重複指が生じることから、極性活性化領域（ZPA）と称されるこの領域によって AP 軸の極性が形成されていると考えた（Saunders et al., 1968）。そして 1993 年 ZPA 領域に特異的に発現する分泌因子である *Shh* が報告された（Riddle et al., 1993）。*Shh* は間充織 ZPA に発現し、肢芽での前後軸形成能を有する。その *Shh* は AER における *Fgf-4* に維持され、ZPA と AER のタイトな関係に寄与し、*Shh*/*Fgf-4* は正のフィードバックループを形成している。肢芽の伸長においては、AER での *Fgf-8* の発現維持が必要不可欠であり、AER の切除により、四肢先端部（遠位部）が欠損することから、AER とそこに発現する *Fgf-8* は肢芽遠近軸（PD 軸）形成をも制御していると考えられている（Rubin and Saunders, 1972）。Wnt による肢芽の initiation が開始されると肢芽間充織に *Fgf-10* の発現が誘導される（Kawakami et al., 2002）。*Fgf-10* は外胚葉に作用して肢芽間充織の増殖維持に必要な因子を発現する肢芽表皮へと誘導を行う（Ohuchi et al., 1997）。特に肢芽先端部の表皮は肥厚して前後に走る AER を形成し、直下に発現している *Fgf-10* の発現を維持し間充織の増殖を支持する。AER には *Fgf-8*、*Fgf-4* が発現し *Fgf-10*/*Tbx5* との positive feedback により肢芽が成長していく。*Fgf-8*、*Fgf-4* を肢芽特異的に標的遺伝子破壊したマウス

の後肢では肢芽の initiation は起きるが骨格が全く形成されないことから *Fgf-8/Fgf-4* は肢芽の伸長に必須の遺伝子であることが分かっている (Sun et al., 2002)。このような *Shh/Fgfs* の関係は肢芽伸長を制御し、AP 軸、PD 軸の形成に深く関与している。

一方、AER と直下の間充織には、FGF とは異なるオーガナイザー分泌因子 BMP が多数発現している。そして、これら BMPs は肢芽において、細胞増殖、分化、プログラム細胞死などの多くの役割を持っている (Yokouchi et al., 1996)。BMP 特異的な分泌抑制因子 *Noggin* を肢芽に強制的に発現させると、AER が前後に異所的な伸長を見せ、さらに DV 軸の乱れが見られる (Pizette and Niswander, 1999)。このことは、AER の構築において、BMP は負に働いており、内因的に BMP の AER 異所的伸長能を抑える因子 (すなわち AER 形成維持因子) の存在が予測された (Zwilling, 1956)。さらには、BMP を肢芽に過剰発現させると、*Fgf-8* の発現低下を引き起こし、AER を崩壊させ、結果、手先のない四肢ができる (Pizette et al., 2001)。これら、BMP の機能阻害、強制発現実験より、BMP シグナルは AER の構築に必要であり、AER と PD 軸形成と密接に関わっていることから、AER 形成維持因子が PD 軸形成に多いに関与することが予想される。

このような AER 形成維持因子の役割は理解されているが、実態はつかめていない。なぜなら、BMP 抑制因子である *Noggin* の発現は肢芽で見られないからである。肢芽に発現する BMP 抑制因子に *Gremlin* がある。分泌因子であるこの *Gremlin* の強制発現では、*Noggin* 強制発現と同様の AER の異所的伸長が見られる (Capdevila et al., 1999 and Merino et al., 1999)。このことから、*Gremlin* が真の AER 形成維持因子であると考えられるようになったが、AER 自身に発現していないという不可解な点はいまだ残っている。

Dachshund は「分子機能」の項で述べたように、新規の BMP 細胞内抑制因子である。ハエ *Dac* の変異においては、脚における PD 軸中間部分の欠損が見られる。ハエにおいて BMP 相同分子である *Dpp* と *Dac* の遺伝的関係は推測されていた (Gonzalez-Crespo et al., 1998)。さらに、脊椎動物を用いた本研究における発現解析より、BMP と *Dach1* の相関は予測されている。

この「肢芽形成」では、ニワトリ *Dach1* と BMP の抑制性の相関が、肢芽形成にとって不可欠なものであることを証明し、さらに AER 形成維持因子が、AER に発現する BMP 抑制因子であるという基本的な考えをより明確にする結果となったことを述べる。さらに、ハエでも明らかにされていない PD 軸形成の分子的解釈が可能となったことを報告するものである。

結果

Dach1 は BMP の発現と重複する

肢芽発生期においては、間充織 *Fgf-10* の発現を機に、間充織内においては *Wnt-5a* とポジティブフィードバックループを形成しそれぞれの発現維持をおこなっている。また、上皮 AER に *Fgf-8* を誘導し、肢芽の伸長が行われる。*Bmp-4* は *Fgf-10* の発現開始に少し遅れるが、間充織に発現が認められ、特に前側に強く発現し、AER に発現している。St20 では、背側神経管とともに間充織と AER 直下に発現し、St21 には、後方間充織にも発現が始まり、St23 では特に表皮直下の前方間充織に発現が持続していた (図 10D-F)。*Dach1* の発現は、*Bmp-4* と同時期に肢芽の前側に発現し、その後 St19 以降には AER にも発現する。St19 では、背側神経管、体節の側方領域、前方間充織に発現が見られ、St20 には AER、前方間充織が特に強い。しかし、後方間充織の一部では発現が衰退しており、ここは *Shh* が発現する ZPA であった。また、St23 では肢芽領域全体に発現しているが、中央部では弱く、ここは *Gremlin* が発現する領域であった (図 10A-B)。

さらに、切片で詳しく発現解析を行った。St13 の前後に予定 AER 領域が上皮に規定され、*Fgf-10* に支持された細胞増殖を盛んに行うことで、予定肢芽領域が次第に膨らみ始める。この時期 St13 では、予定肢芽領域全体に *Dach1*、*Bmp-4* が発現し、*Msx-2* は予定肢芽腹側のみに発現していた。図における DV 軸の境界は黄色矢頭で、肢芽領域の腹側限界を赤矢頭で現している。BMP により誘導される *Msx-2* は肢芽の腹側を規定する因子として知られる (Pizette et al., 2001)。すなわち、*Bmp-4* はこの時期 (DV 軸決定は St13 過ぎと考えられ、St15 にその活性の頂点を迎える) に腹側因子として働いている。一方、*Dach1* の発現をみると DV 軸において、なんら偏りもなく発現している (図 10G-I)。発生が進み、St15 になると肢芽領域全般において *Dach1* の発現は一度消失するが、*Bmp-4*、*Msx-2*、また背側因子 *Wnt-7a* は明確に、その DV 境界をもって発現している。このことから、*Dach1* は DV 形成時期に発現が弱まり、DV 時期に影響を及ぼさないと考えられる。肢芽が膨らみ、AER も構築された St19 では、*Dach1* は肢芽全体と AER に、*Bmp-4* はより遠位側肢芽間充織と AER に発現していた。*Msx-2* は腹側に強く、すでに DV 軸での明確な境界は消失していた。一方、*Wnt-7a* は上皮において AER 以外の背側に発現が持続していた (図 10J-Q)。

Dach1 のドミナントネガティブを作成した

肢芽形成を理解するうえで、遺伝子の導入、破壊は非常に有用な手段である。ニワトリ胚に強制発現する場合の、*Dach1* 機能阻害型を模索した。まず、*Dach1* は強力な転写抑制能を有するので、転写活性を Active に変換することを考え、VP16 の転写活性化ドメインを融合させた *VP=Dach1* を作成した。C2C12 細胞において、全長 *Dach1* に対する *VP=Dach1* の影響を見ると、*Dach1* の転写抑制能を阻害し、量依存的な転写活

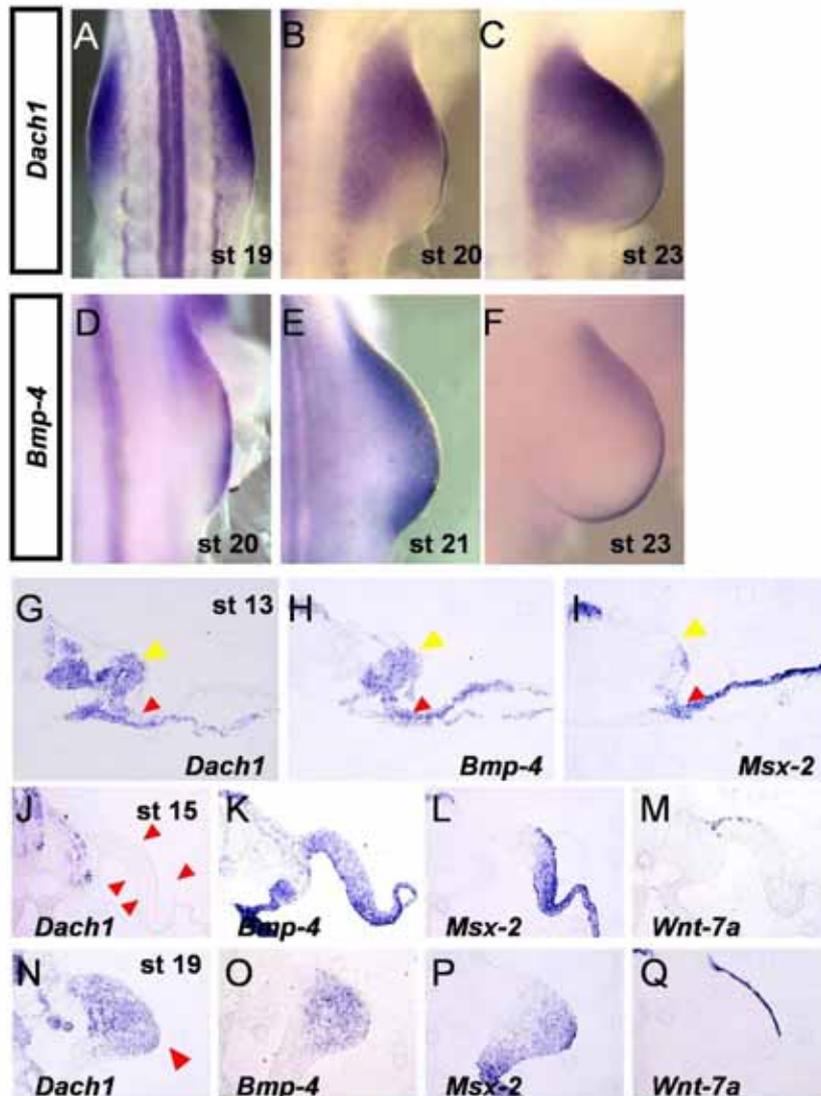


図 10 *Dach1*と*Bmp-4*の発現比較

(A)肢芽において、*Dach1*はSt17の間充織に発現が始まり、St19に強くなる。同時に、神経管と体節にも見られる。(B)St20において、*Dach1*はAERと間充織の両方に発現するが、後方部位は陰性であった。(C)St23では、肢芽の間充織全体に広がり、AERにおいても強い発現が維持される。(D-F)*BMP*は間充織前方とAER、またAER直下の間充織に発現していた。(G)*Dach1*はSt13には予定AER領域に陰性である(黄色矢頭)。赤矢頭は肢芽の腹側限界である。(H) *Bmp-4*は*Dach1*陽性領域にて、同じく陽性であった。(I) *Msx-2*は肢芽領域全体に薄く発現し、腹側には強かった。(J-Q)*Dach1*はSt15に一時、肢芽領域の発現は消失し、肢芽は膨らむとAERと間充織に発現がみられた。*Wnt-7a*は背側にのみ発現していた。*Dach1*の発現にDV軸に影響するようなパターンではなかった。

性化能を示した(図 11A)。したがって、この $VP=Dach1$ は *Dach1* の機能を逆転させ、抑制されていた標的を活性化する、内因性 *Dach1* 機能に対してドミナントネガティブ型として機能することを確認した。

また、第1部で述べたように、*Dach1* はN末端側とC末端側にそれぞれ種間で保存された領域を持っている。細胞染色像からもそれらを除外した型は、異なった挙動を

しめし(図 3B) 全長 *Dach1* の機能になんらかの影響を出すと予想された。単独では、C2C12 細胞内で *Xvent2-Luc* においてなんら影響を及ぼさなかった(図 11B)が、全長 *Dach1* 存在下では、C 末領域の DD2 が量依存的に *Dach1* の抑制を解除し、*Dach1* の抑制能を ZERO-STATE にする機能を持つことがわかった(図 11B)。つまり、DD2 は、*Smad1 Dach1* 依存的な BMP シグナルを細胞内で OFF にすることができるものである。これら、二つのドミナントネガティブを用いて、以後 *in vivo* での解析を行った。

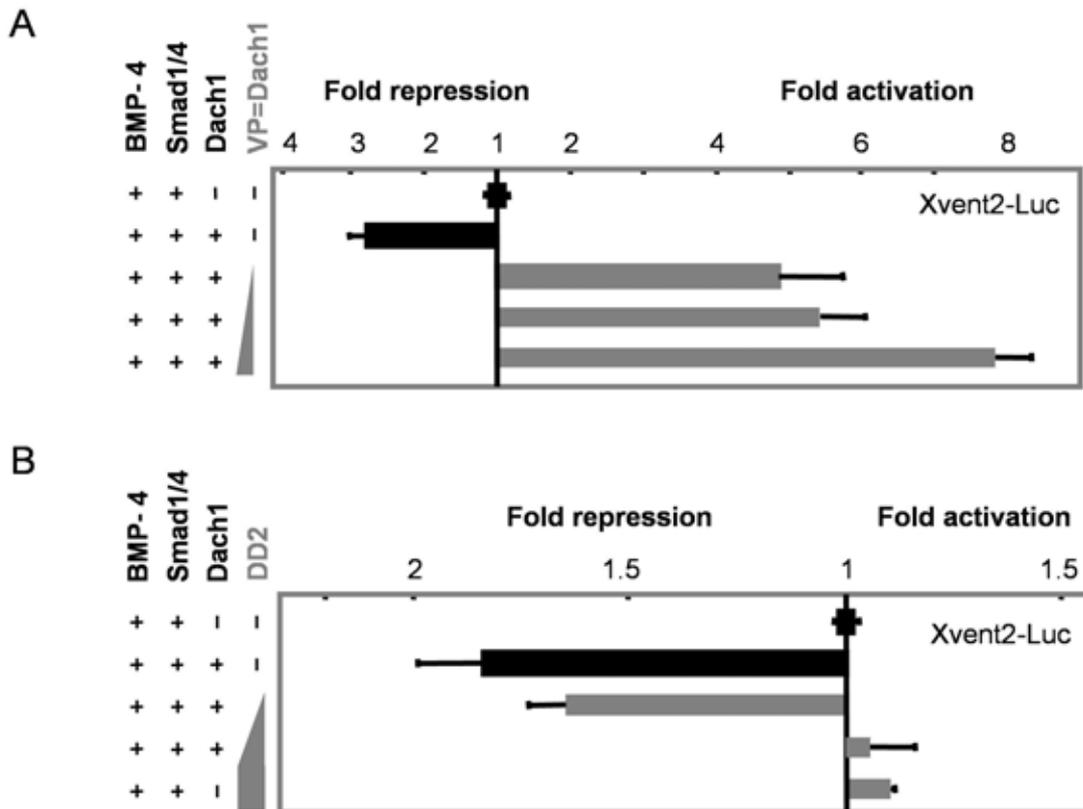


図 11 *Dach1* の機能阻害

Xvent2-Luc を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。(A) *VP=Dach1* は全長 *Dach1* の抑制を解除し、さらに *Xvent2-Luc* を活性化した。(B) DD2 は、全長 *Dach1* の抑制を解除し得るものの、*Xvent2* プロモーターを活性化状態にすることは出来なかった。

AER における *Dach1* の機能は AER を正常に構築することである

AER 形成メカニズムを知るために、遺伝子を導入する場合、AER が形成される時期で遺伝子の効果が出るような導入法を用いなければならない。上皮における BMP シグナルにおける *Dach1* の機能を知るため、図 12 模式図のようにエレクトロポレーションを行った。まず DNA 溶液を胚の上から予定 AER 領域付近の上皮に垂らし、卵黄側に電圧をかける。そうすると、DNA と接している上皮のみに DNA が取り込まれる(図 12D)。St8-11 の胚に導入し、St19 にて *Fgf-8* の発現を観察すると、DNA を導入していない左側のような滑らかな発現(図 12A 左側)は消え、途切れた様式でわずかに発現が認められた(図 12B)。このような胚を、St24 まで成長させると AER は完全に崩壊

し(図 12CD)、*Fgf-8*の発現は寸断され、AER における *BMP-7*の発現は一部消失していた。さらには、AER においての *Fgf-8*の発現低下により、肢芽の成長阻害がおり、*Fgf-10*で表現される間充織の大部分までも欠損する個体も現れた(図 12E-F 赤矢頭)。しかしながら、肢芽の成長阻害以外に、肢芽後方に発現する *Shh*の発現に影響を与えることはなかった(図 12H 青矢頭)。胚を 1 週間培養すると、前肢では 3 本の指が作られるが、最前の第 2 指が低形成し、後肢では第 2, 3, 4 指すべてが消失し、肢芽遠位部が完全に欠損したのが見られた。BMP 受容体の強制発現や、BMP 蛋白をしみこませたビーズを導入した肢芽で、これと同様の結果が得られる (Macias et al., 1997)。また、同様の結果は DD2 を導入した場合にも得られた(図 17 補 A-C)。以上より、AER における BMP シグナルの抑制は必須であり、その抑制メカニズムには *Dach1* 関与していることが明らかとなった。これは AER 自身において、AER の形成を維持する、細胞内 BMP 抑制因子の初めての登場である。

間充織において、*Dach1*による BMP シグナルの抑制は AER のイニシエーションを行っている

肢芽形成の開始は、前述した *Fgf-10*からの上皮 *Fgf-8*へと繋がっていく。ここに、間充織と上皮とのいまだ解明されていない関係が存在している。間充織に一樣に発現する *Fgf-10*が、どのように一部の上皮にのみ *Fgf-8*を誘導するのか。また、早くから発現している間充織 BMP シグナルと AER 形成との関与はどのようなものか、これらを探るため、間充織にのみ DNA を導入する方法を開発した。DNA 溶液を上下側板中胚葉の間に注入した。2 つに分かれたこの時期の中胚葉は、上部が肢芽間充織に下部が内臓筋、体幹部の皮膚直下の筋に運命付けられている。導入された EGFP 陽性の肢芽間充織は肢芽上皮、AER では観察されなかった(図 13A)。この導入方法を用いて DD2 を導入したところ、24 時間後の St20 肢芽前方部において *Fgf-10*, *Wnt-5a*の発現消失が起こった(図 13B,C)。このときに AER においては、*Fgf-8*の発現に乱れ(Blurred)が生じ、同様に AER マーカーである *En-1*や *Msx-2*も異常になった(図 13D-F)。St24 では *Fgf-8*が不規則に少し DV 軸方向に広がった様相をみせ、AER 内に *Fgf-8*の陰性スリットがわずかに見られた(図 13G)。

BMP は腹側に *En-1*, *Msx-2*を誘導し、DV 軸形成の上流に位置している (Pizette et al., 2001)。したがって、DD2 導入胚での DV 軸への影響を調べた。切片を DV 方向に作成し、背側あるいは腹側マーカーの変化を見た。背側マーカーである *Wnt-7a*, *Lmx1b*は明確に背側に発現しており、腹側マーカーである *BMP-7*, *Msx-2*にも変化は見られなかった。よって、DV 軸への影響は認められなかった(図 13H-K)。しかし切片を詳細に観察すると、AER 自身は分厚くなっており、AER の構造に変化が生じていることがわかった(図 13H-K 赤矢頭)。

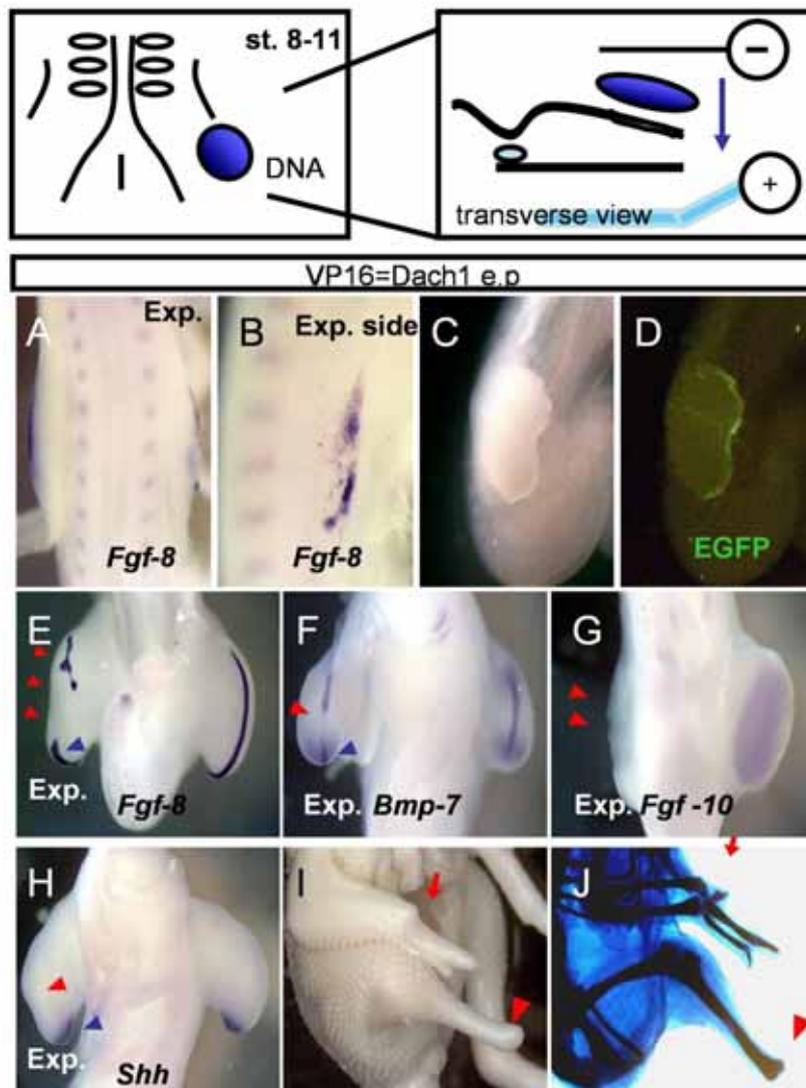


図 12 VP=Dach1を上皮に強制発現

最上段はエレクトロポレーション法の模式図である (A)エレクトロポレーション胚の背側からの写真。Fgf-8の発現を示す。EXP.は導入側であり、向かって左側がコントロール。(B)導入サイドのFgf-8の発現。クリアな境界、線が見られなくなった。(C)St24、AERが壊れているのがわかる。(D)Cと同じ個体で、導入部分のGFPは上皮にのみ導入されている。(E)Cの個体のFgf-8の染色像。AERが壊れている。(F-H)St24での染色。BMP-7のAER発現、Fgf-10の間充織の発現が消失しているが、肢芽後方部のShhは変化がなかった。(I,J)1週間培養した結果、四肢先端部が完全に消失していた。赤矢印は、羽での2番指の欠損を示し、矢頭では、足の手先が完全に欠損していた。Jはアルシアンブルー染色。

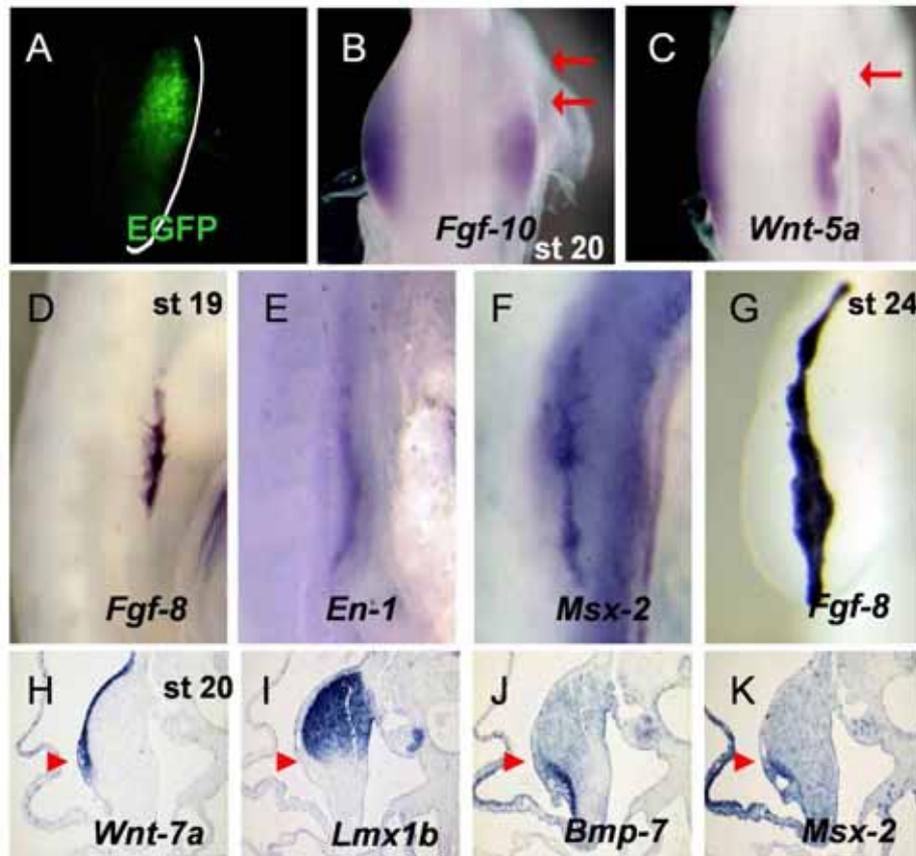
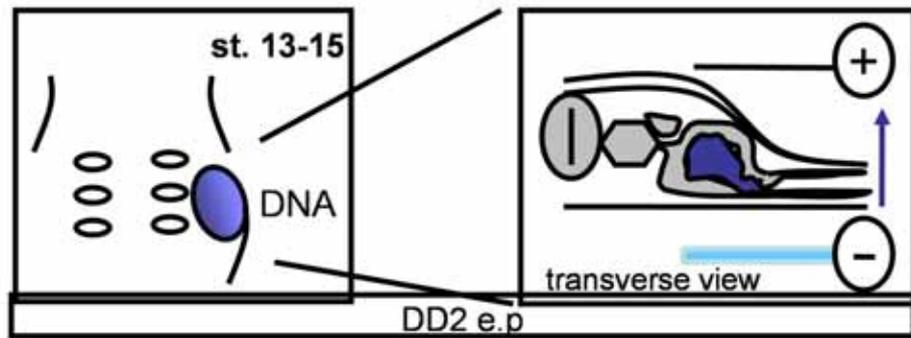


図 13 DD2を間充織に強制発現1

最上段はエレクトロポレーション法の模式図である。(A)間充織への導入をEGFPでモニターした。間充織にのみ導入されているのがわかる。(B、C)DD2を導入し、*Fgf-10*、*Wnt-5a*の発現をみた。前方間充織にて発現低下がみられた。(D-F)St19における、上皮の*Fgf-8*、*En-1*、*Msx-2*の発現は、崩れが生じていた。(G)St24では、広がったAERがみられ、間に*Fgf-8*陰性の部分が現れていた。(H-K)DV軸に関わる遺伝子群の染色。DV軸に変化はなかった。

詳しく切片で DD2 の結果を観察すると、AER やその付近の上皮に強く影響が出ていることが観察された。特に、激しいものでは上皮が間充織内に突入していた(図 14A)。そのような枝芽では、*Fgf-8*の発現は陥入した部分に発現していた(図 14B)。細胞周期マーカである *CyclinD1* は盛んに増殖する間充織で強く発現する、このため明確に上皮が陥入していることがわかる。また陥入部分の周辺において *CyclinD1* の発現低下が起こっていない(図 14C)ことから、間充織での増殖低下により、上皮が2次

的に陥入したものではないことが明らかである。次に *tublin* を観察した。*tublin* は神経軸策に強く発現するが、肢芽では特に腹側の上皮に発現している (図 14D)。DD2 導入個体において、*-tublin* 陽性の上皮が間充織の深くまで観察された (図 14E,G)。導入細胞を示す GFP と重ね合わせると、導入された GFP 陽性間充織の付近に上皮が陥入していた (図 14F)。このとき、*Fgf-8* は 陥入した上皮に発現していた (図 14H)。

ホールマウントで *Fgf-8* を観察すると、*Fgf-8* の発現は平たく広がった様相であった (図 14I)。St24 では、肢芽は 2 つに分断され、*Shh* は内側、外側とも正常と変わらぬパターン (発現強度は内側が少し弱い) で、また *Gremlin* も双方の肢芽中央部に正常と同様な発現様式であった (図 14J,K)。結果、成長した前肢は DV 軸に 2 列の指ができる重複指形態を示した (図 14L,M)。図 14L-P では、内側の新たにできた指を赤で示してある。この個体をアルシアンブルーで骨染色すると、2 列の指ができており、内側の指は少し低形成ではあるが正常な指骨パターンで出来ていることがわかる。特に、前側 (ヒトで言う親指側) から見たのが図 14 の O であり、背側、腹側の同位置に 2 本の重複した指が見られる。模式図であらわすと図 14 の P のようになる。手先が 2 列になる理由を、AER の分裂 (中央に *Fgf-8* 陰性部分が出る図 14 G) あるいは上皮の陥入による肢芽の分断の 2 つによるものと考えている。

以上の結果は、*Dach1* の BMP アンタゴニズムが肢芽 AER の形成に、上皮から、また間充織から総合的に関与することを明らかにしたものである。

BMP シグナルにより PD 軸は決定される

以前から BMP が近位部に発現する遺伝子を抑制することが知られている (Capdevila et al., 1999)。このプロセスに *Dach1* が関与している可能性は大きい。ハエにおいて、*Dac* は遠近軸中間領域に発現し、*Dpp* は遠位部に発現している。また、*Hth* が遠位部のみに強く発現していることが知られており、この *Hth* が遠位部を決定付けるに必要十分であることがわかっている (Wu and Cohen-1999)。また、遠位部の形成において、初期に *Dac* 発現細胞と *Hth* 発現細胞が混ざって出現し、徐々にそれらは分離することで *Hth* 陽性領域が近位部として、*Dac* 陽性部分が中間領域となる (Goto and Hayashi., 1999)。

それでは脊椎動物ではどうか。脊椎動物においては *Dach1* と BMP はともに AER に発現しているが、間充織において BMP は遠位部に強く、*Dach1* は肢芽全体に発現している。*Hth* の相同分子 *Meis-2* も含めて、もう一度、肢芽遠近軸にそって詳しく発現解析を行った。遠近軸に沿った細胞運命が決定されていないとされる St18 において、*Bmp-4* は AER と直下の間充織に発現している (図 15A)。

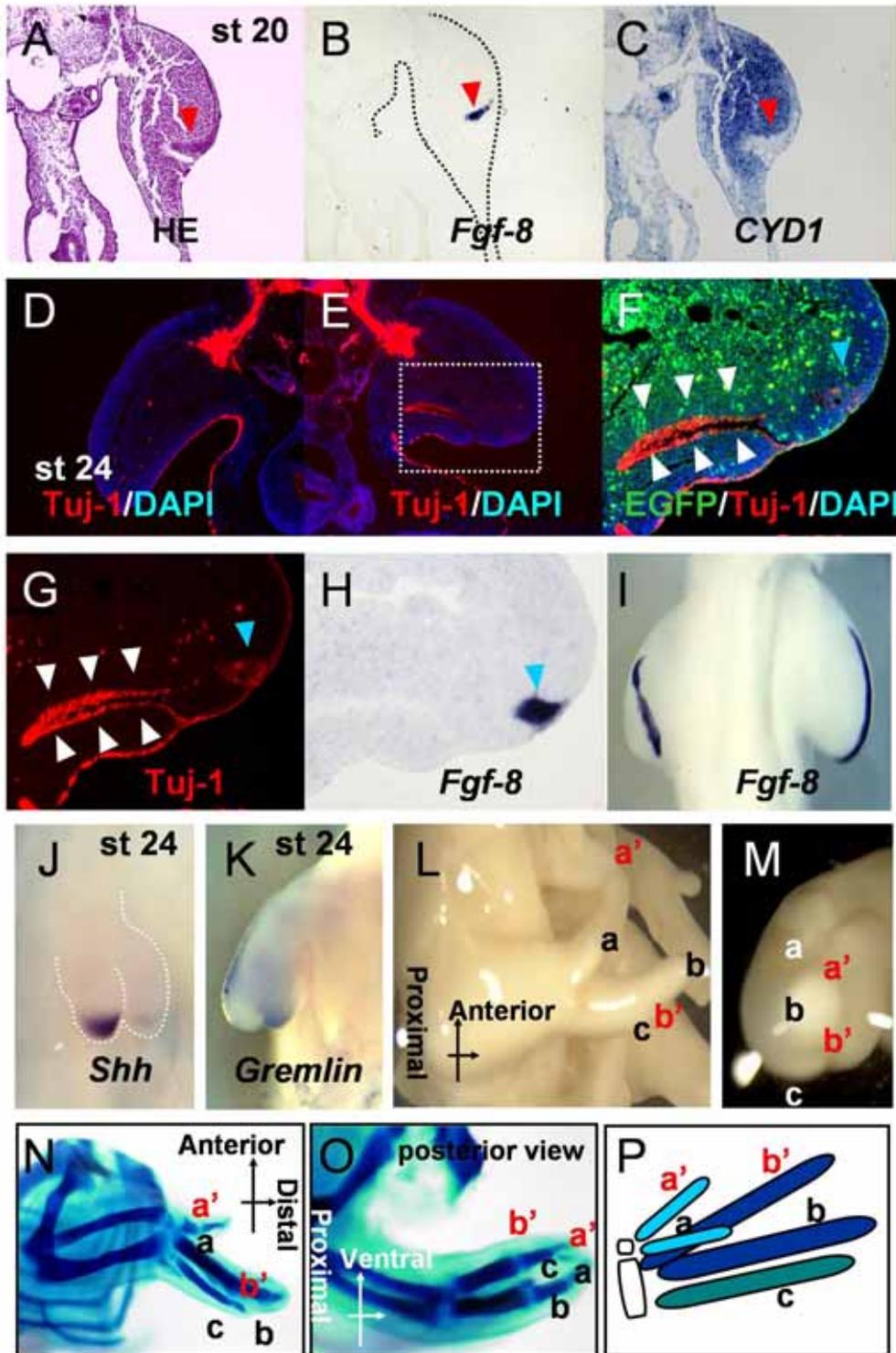


図 14 DD2を間充織に強制発現

(A-C) St20において、上皮が間充織に陥入したのがみられた。これらは、*Fgf-8*陽性のAERも含んでいた。また、*CyclinD1*で間充織を染色すると、上皮が陥入したことがわかる。(D)正常肢芽の tublinの染色(*Tuj-1*)は、腹側上皮に染色が見られる。(E)DD2強制発現では、*tublin*が陥入下上皮でもみられ、腹側が特に陥入しているのがわかる。(F,G)Eの囲い部分の拡大図。*Tuj-1*染色は陥入している上皮にはっきりと見られ、厚いAER(青矢頭)も確認できる。陥入しているのが、導入された間充織(EGFP)の周りであることがわかる。(H)*Fgf-8*は厚くなった上皮に発現していた。(I)腹側からみると、*Fgf-8*はフラットに広がっていた。(J,K)St24、2つに割れた部分で*Shh*、*Gremlin*の発現がみられ、これらの四肢は2つに分かれていた。(L-O)骨染色にて、指が2本重複しているのが確認できた。Pは表現型の模式図である。

前項で述べたように、BMPシグナルは細胞内で *Smad* のリン酸化を引き起こす。*P-Smad* はリン酸化 *Smad1.5.8* に対する抗体であり、この染色像は BMP シグナルの ON な領域を示すとされている。*P-Smad* は肢芽間充織の遠位部側に強く、とくに背側では染色が弱い。*Gremlin* がこの時期の背側間充織に発現するため、背側において BMP シグナルが抑制されていると考えられる (図 15C,B)。このとき、*Dach1* は肢芽領域の発現は弱い (図 15D)。一方 *Hth* の相同分子である *Meis-2* は肢芽領域全体で強く発現していた (図 15E)。遠近軸が決定するとされる St20 前後になると BMP は顕著に遠位部に限局し、*Meis-2* と相補的な発現を示しており、*Dach1* は遠位部と中間領域に発現していた (図 15F-H)。その後、間充織の BMP の発現は衰退し、*Dach1* の発現も弱くなり、*Meis-2* の発現は完全に遠位部から消失していた (図 15I-K)。このことから、脊椎動物においても、遠 ; *Bmp-4*、中間 ; *Dach1*、近 ; *Meis-2* というハエと同様な遠近軸形成機構が存在していることが推測される。しかしながら、ハエにおいては遺伝的な解析にとどまっており、実際の *Dpp* と *Dac* と *Hth* の分子的相関は示されていない。

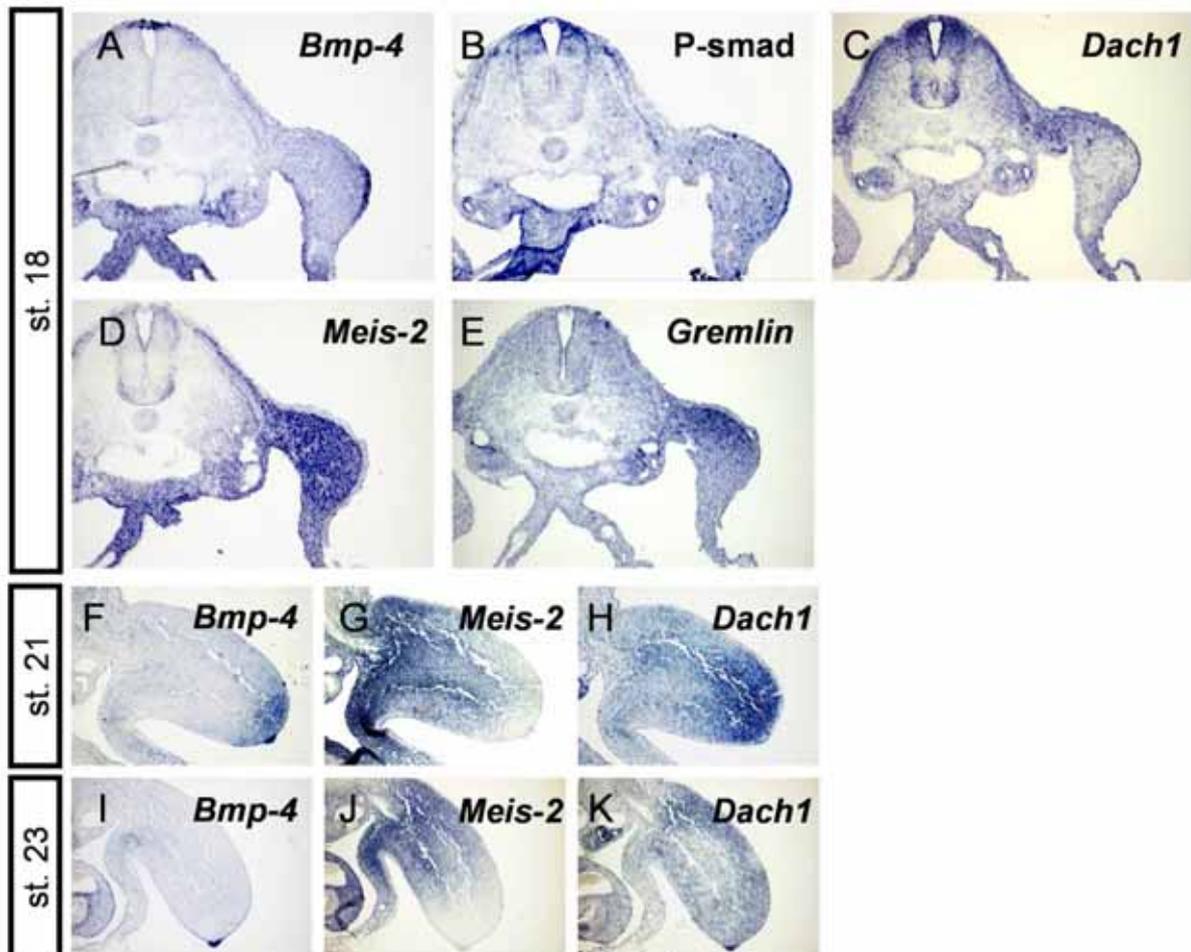


図 15 BMPシグナルの発現と遠近軸における発現解析

(A,B)St18 に *Bmp-4* は AER と肢芽間充織に弱く発現し、その結果リン酸化された *Smad1/5/8* (*P-Smad1*) の染色が上皮と間充織に見られる。(C-E) *Dach1* は肢芽の背側に強く、*Meis-2* は肢芽全体、*Gremlin* も背側に強い。(F-K) 遠近軸が形成される頃、BMP は遠位部に、*Meis-2* は近位部に *Dach1* は遠位部と近位部の一部に発現する。

DD2 を St15 の間充織に導入すると St17、St19 において、コントロールと比べて *Meis-2* 発現細胞の増加、領域拡大が見られた (図 16A-F)。 *Meis-2* の発現は、より上皮に近い間充織で強い。導入された GFP 陽性細胞は腹側に多く見られる。結果、腹側により強く *Meis-2* が発現誘導され、枝芽の表裏における極性が逆転した形となった。このことは、 *Dach1/Meis-2* は枝芽の新たな極性形成 (表裏軸) に関わる可能性を示唆しているのかもしれない。一方、以前に報告されているが、BMP 蛋白発現ビーズを枝芽に移植すると *Meis-2* の mRNA 発現が減少する。同様の実験を詳細に行ったところ、枝芽前側においてはその反応性がよく、後方ではほとんど効果がなかった (図 27G)。これは、 *Dach1* の内因性の発現と呼応している可能性が考えられる。また、第 1 部で述べたように *Dach1* は BMP 標的遺伝子の転写を抑制する。これらのことを考え合わせると、BMP の標的として *Meis-2* があり、その転写抑制に *Dach1* が関与している可能性は大きい。

これを検証するため、DD2 を導入した枝芽に BMP ビーズを移植した。その結果、BMP の *Meis-2* mRNA 転写抑制がキャンセルされた (図 16H-I)。また、 *Dach1* 標的遺伝子の転写を強制的に活性化する *VP=Dach1* を間充織や間充織と上皮に導入すると *Meis-2* の異所的な発現が見られる (図 16F-H)。これらより、 *in vivo* において *Dach1* は BMP シグナルを抑制し、PD 軸においての標的として *Meis-2* があることが考えられた。

次に、分子的な *Dach1/Smad/Meis-2* の関係を探るため、 *in vitro* にてアッセイを行った。ヒト *MEIS* ゲノム転写制御領域の役割を知るため、まずルシフェラーゼと TK プロモーター (thymidine kinase) の上流に *MEIS-1* ゲノム転写制御領域 (開始メチオニン上流 700bp) を融合したレポーター DNA を作成した。

この領域を *Meis-1, -2* において比較すると非常に相同性が高く、またニワトリ、マウスでの *Meis-1, -2* の発現領域はほぼ同一であることから、この領域が *Meis* 発現に関わる重要な場所であると推測できる。

このレポーターは BMP に反応し、 *Dach1* で濃度依存的に抑制を示した。さらにコリプレッサー複合体 *mSin3A* を添加すると、 *Dach1* による抑制は増強され、逆に *VP=Dach1* では転写を活性化した (図 16J)。 *Dach1/Smad* 複合体が、 *Meis* ゲノム転写制御領域に作用し、 *Meis* mRNA 負に制御していると示唆される。これらのことから、 *Dach1* は PD 軸の形成に直接的に関与し、BMP シグナルを介して *Meis* の発現を制御していると考えられ、 *Bmp-4/Dach1/Meis-2* により枝芽 PD 軸が形成されていくことが明らかとなった。

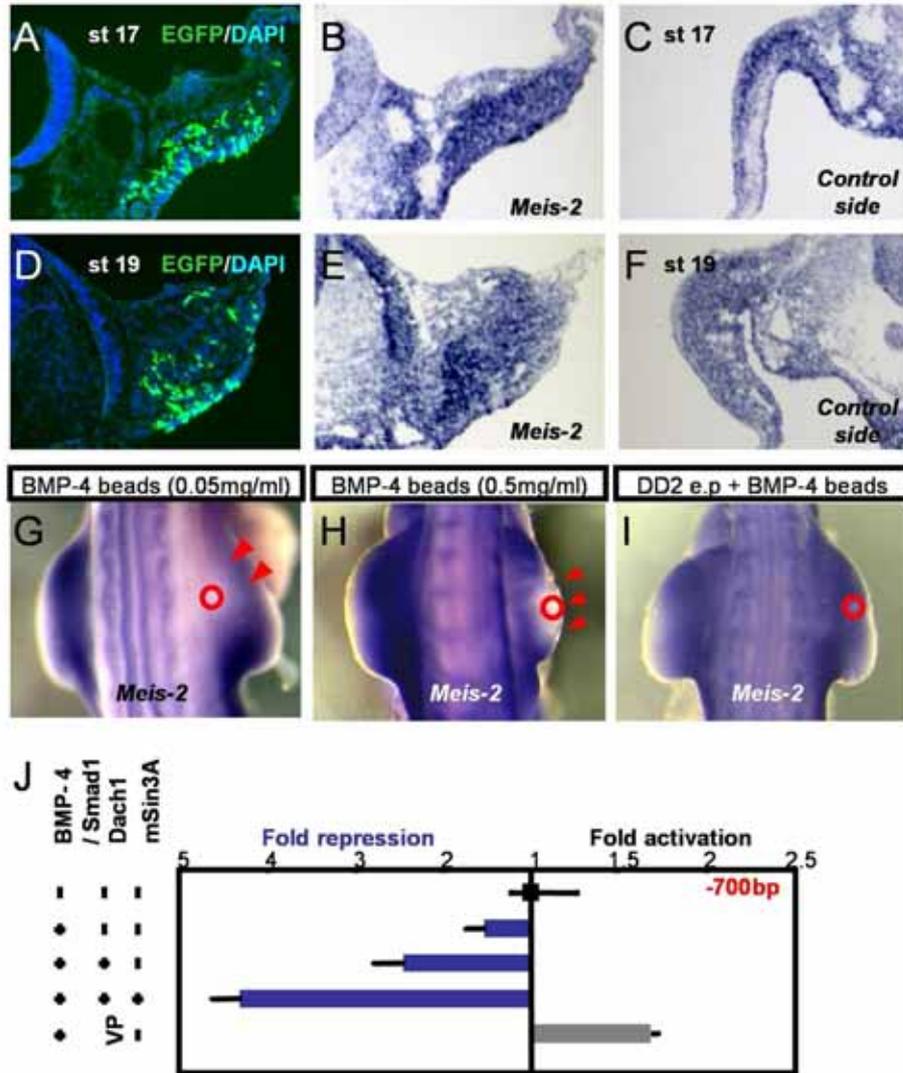


図 16 *Dach1*と遠近軸形成

(A-F)DD2を間充織に導入した、St17 (A-C)。St19 (D-F)に*Meis-2*の発現は誘導されていた。導入部位をGFPでモニターすると、細胞自律的に誘導されているのがわかる。(G,H)BMPビーズを肢芽間充織に移植すると*Meis-2*が減少する。赤いサークルがビーズの場所。(I)DD2導入済みの個体にビーズを移植すると*Meis-2*の抑制がキャンセルされた。(J)ヒト*Meis-2*転写制御領域(TATAボックス上流700塩基)を用いたレポーターアッセイ。*Dach1*により、抑制され、mSin3Aによって増強された。またVP=*Dach1*では活性化された。

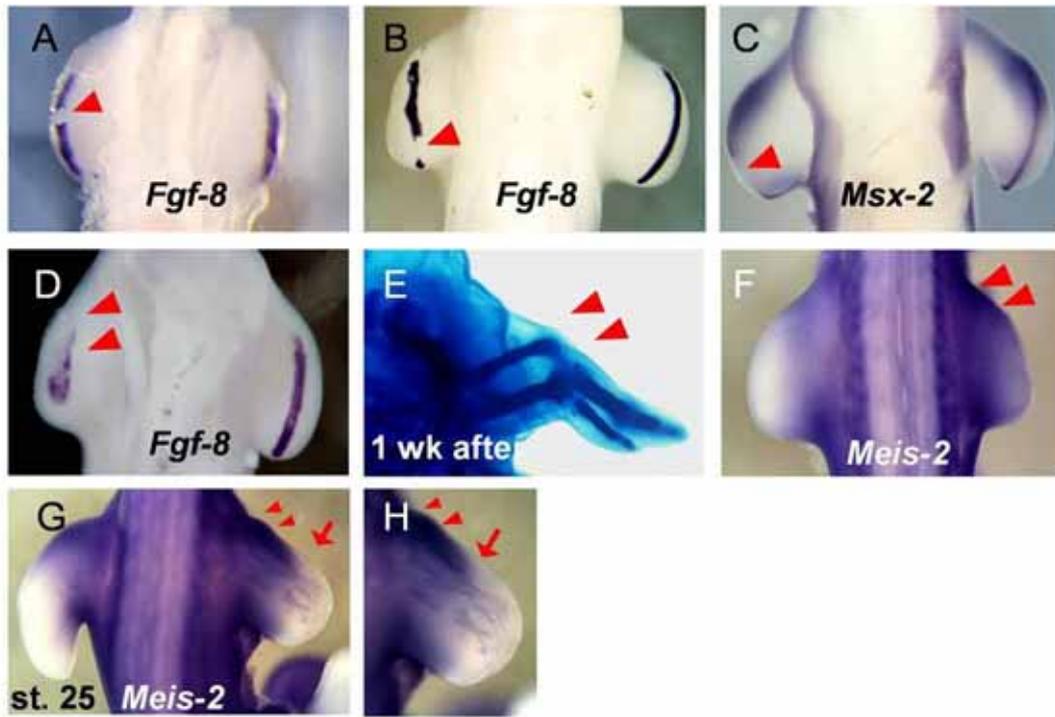


図 17 補

(A-C)DD2を上皮にのみ導入した場合の結果。VP=Dach1と同様であった。(D,E)VP=Dach1を間充織に導入すると、AERがひろがり、先端部の欠損が確認できる。(F-H)VP=Dach1を間充織に導入すると、Meis-2の発現上昇が見られる。また、間充織と上皮の両方に導入した場合にも、両方でMeis-2の発現が上昇していた。

考察

BMP シグナルは、細胞外、細胞内で様々な制御を受ける

本項では肢芽形成の中での BMP シグナルに着目し、細胞内 BMP 抑制因子としての *Dach1* の機能について述べてきた。今までの BMP シグナルの解析において、*Gremlin* や *Noggin*、そしてドミナントネガティブ、ドミナントポジティブ BMP 受容体が用いられてきた。これらとは異なり、細胞内で *Dach1* は *Smad* と大きなリプレッサー複合体を形成し、そのシグナルを抑制する。このことは、肢芽において BMP は細胞外、細胞内の両方で制御されていることを示している。

BMP シグナルは、細胞内において様々な調節を受ける。*Smad1/4* と *STAT3* による転写活性化、あるいは *Ski/Sno* による転写抑制化などの転写においてもまったく異なるエフェクトを出すことが可能である。最近では、RING フィンガーE3 ユビキチンリガーゼである *Highwire* が *Smad* と結合し、BMP シグナルを調節することが明らかにされた (McCabe et al., 2004)。また、*Dach1* については TGF-シグナルに参与し、*Smad4* と結合することも示され、*Dach1* が *Smad* の転写制御に多岐にわたって関与することを示している。

AER 形成では Fgf *Dach1* のフィードバックループが存在する

Dach1 は初期の発生期に発現は見られない。AER における *Dach1* の発現は St20 前後

から開始する。このことから、AER の構築開始時期あるいは DV 軸形成期において、*Dach1* は機能しておらず、AER 内においては、その維持に働いていると考えられる。また、マウスやニワトリを用い、FGF ビーズあるいは FGF 産生細胞移植による *Dach1* の発現を見たところ、*FGF-8* により *Dach1* の mRNA 誘導が起こる (Doetsch et al., 2000)。これらより、AER 初期に発現開始した *FGF-8* は、その AER 構造、その発現維持のために BMP シグナルでの転写活性を負に制御する *Dach1* を AER 自身にて発現誘導する。*VP=Dach1* を予定 AER 領域に発現させ、あるいは恒常的 BMP 受容体を発現させると AER の崩壊を引き起こす (図 12、Horner et al., 2002)。また、DD2 を肢芽間充織に強制発現させると、間充織で *Fgf-10* などの発現が消失し、結果 AER に異常が出る。これらの結果から、*Dach1* は上皮、間充織の双方より、総合的に AER の形成、維持に関わり、BMP シグナルを抑制的に機能させることが、正常発生に必須であることを示している。

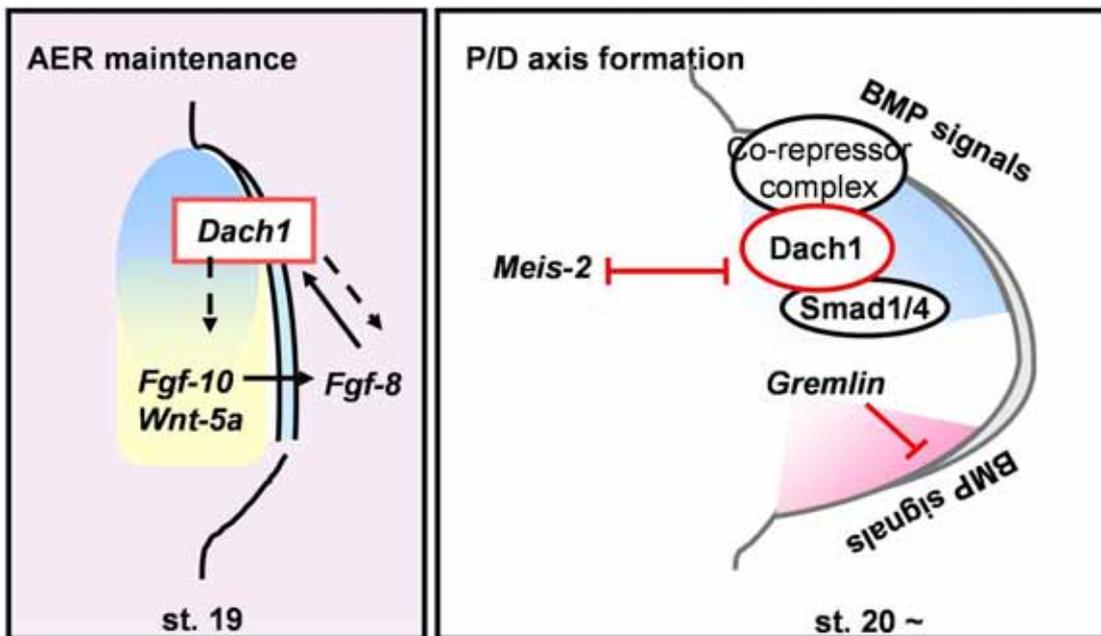


図 18 肢芽形成における *Dach1* の役割

(左) *Dach1* は上皮においては、*Fgf-8* とフィードバックループにより発現維持をおこない、間充織においては、*Fgf-10*, *Wnt-5a* の発現を維持することで、上皮に AER (*Fgf-8*) を誘導する。

(右) BMP シグナルは、遠位部において *Meis-2* の発現を、*Dach1* を介して行っており、そのイベントは主に前方である。後方では、*Gremlin* が BMP-2 シグナルを抑制し、AER 構造を維持していると考えられている。

Dach1 は BMP シグナルの質を変化させる

BMP は細胞外で *Gremlin* にアンタゴナイズされる。一方、抗リン酸化 *Smad* 抗体を用いて肢芽領域を染色すると、弱いながらも間充織と上皮の両方にシグナルが見られる。これは、細胞内で *Smad*, *mSin3A*, *Dach1* 複合体が抑制的に働いていると考えられる。総合的に BMP シグナルを抑制する *Gremlin* と異なり、*Dach1* は *Smad* 標的遺伝子の転写

を抑制する機能を持つが、BMP 受容体から p38 MAP キナーゼを介するシグナル (Kozawa et al., 2002) など、他のシグナルは制御しない。 *Gremlin* や *Noggin*、ドミナントネガティブ型 BMP 受容体の強制発現では、 *Smad1/Dach1* 経路、p38 MAP キナーゼ経路の両方が影響される。一方、DD2 や *VP=Dach1* では *Smad* を介する転写のみに影響が出る。したがって、肢芽領域内にて、BMP シグナル ON、BMP シグナル ON (ただし *Smad* 転写活性 OFF、BMP シグナル OFF) という、少なくとも異なる 3 つのコンテキストを持つ領域が存在することになる。また、可能性としてだが、 *Dach1* が DNA 結合型をもつ可能性があることが報告された (Kim et al., 2002) ことを考慮すると、 *Dach1* と *Smad1* の複合体のみが結合できる転写制御を持つ標的遺伝子のみが、その影響を受けると考えられる。逆に、 *Smad* 結合配列のみをもつ標的は、 *Smad1/4* 複合体により転写が活性化される。それゆえ、標的遺伝子の転写活性は、その制御領域における結合配列の違いによりその制御が異なる可能性があり、 *Smad* はその両方において不可欠な存在である。細胞外 BMP シグナル抑制ではみられたことがない表現形であるので、細胞外と細胞内での BMP シグナル抑制の違いは、DD2 で得られた腹側上皮の陥入として現れているかもしれない。加えて、 *Dach1* とリン酸化 *Smad* 蛋白質との間の量的バランスはとても重要である。過剰な BMP は *Smad1* を核内へ蓄積させ、 *Smad1* と *Dach1* の結合比を変化させ、標的遺伝子の活性化状態に違いが生じるかもしれない。

PD 軸形成の基本メカニズムは保存されている

VP=Dach1 の強制発現で、 *Meis-2* の mRNA が上昇し、発現領域が遠位部へと伸長し、とくに前-遠位部で強くその効果が見られる (図 17)。これは、 *Dach1* が肢芽 PD 軸に関わるということを示している。また、BMP ビーズ移植により *Meis-2* mRNA の発現減少することを考え合わせると、 *Smad1/Dach1* 複合体が *Meis-2* を転写抑制していると考えられる。DD2 を強制発現させると、BMP による *Meis-2* 抑制が解除され、これは DD2 が *Smad1/Dach1* 複合体形成を阻害したと考えられる。ハエでの知見で *Dac* は脚において、PD 軸形成に必須であることが示されている。それゆえ、 *Bmp-4/Dpp* と *Dach1/Dac* の機能的な関係は脊椎、無脊椎動物で高く保存され、 *Smad/Mad* はそのシグナルにおいて中枢を担うものである。

ハエの PD 軸形成は、脚原基の中心部からの *Dpp/Wg* シグナルにより誘導され、最も遠位部 (先端) に *Dll*、中間部に *Dac*、近位部に *Hth* が発現誘導される。これに対し、脊椎動物では、今回の結果も踏まえると、 *Fgf1/Bmp1/Wnt-3a* が AER に発現し、遠位部に *Dlx5/6* (*Dll* 相同分子)、遠位部と中間部に *Dach1* (*Dac* 相同分子)、近位部は *Meis-2* (*Hth* 相同分子) という同じ遺伝的相関が確認される。最近、EGF がハエ脚原基の中心部に発現し、PD 軸形成に関わるという報告がなされた (Campbell, 2002)。EGF は、脊椎動物 AER にも発現する (Dealy et al., 1998)。また、活性型 EGF 受容体の肢芽への導入により、異所的な *Fgf-8* 陽性の AER ができる (Omi, unpublished data)。ま

た、おそらくハエ EGF による MAP キナーゼを介するシグナルは、脊椎動物では FGF と EGF を使用するのかもしれない。これらのことは、EGF シグナルも肢芽先端部の形成に深く関与し、またこれらのシグナルもハエから保存されていることが伺える。

最近 *Dach1* の変異マウスが作られたが、形態的な変化は見られなかった (Davis et al., 2001)。このことは、遺伝的な機能重複が *Dach1*.*Dach2* で存在することを示している。実際、*Dach2* の発現領域は *Dach1* とほとんど重複しているおり、DD2 は *Dach2* による BMP シグナルの抑制も解除しうる (Data not Shown)。さらに、*Ski* も *Smad* に結合する転写抑制因子であり、BMP シグナルでの転写活性を負に制御することが知られており (Takeda et al., 2003)、肢芽領域に発現している。これらのことから、肢芽領域の形態形成には様々な転写制御メカニズムが存在し、重要な役割を担っていることがわかる。

今回の知見は、細胞内 BMP 抑制因子である *Dach1* が肢芽 AER 形成、PD 軸形成に多く寄与し、さらに *Smad1* と *Dach1*、コリプレッサー複合体の直接的な結合が肢芽形成に大きな役割を持っていることを示したものである。また、*Dach1* の分子メカニズムの解明により、脊椎、無脊椎動物間で高く保存された遺伝的プログラムに新たな知見を与えるものである。

神経管発生

序

細胞の分化、未分化維持に関する最近の研究は目覚ましいものがある。組織特異的な幹細胞の分化制御は、再生へと新たな道を見つけ、将来的に大いに医療に貢献できる知見となりつつある。

神経においては、古くより考えられてきた幹細胞非存在説を覆す2つの論文が報告された（Johansson et al., 1999 and Doetsch et al., 1999）。両論文で報告された神経幹細胞の存在部位、多少のマーカーの違いはあるが、神経組織にも幹細胞が存在していることを明らかにし、その結果、神経再生という夢をかなえることが現実味を帯びてきた。

しかしながら、神経組織の再生は、かなり昔から行われていた。パーキンソン病の治療である。パーキンソン病は、線条体黒質神経細胞の脱落による、ドーパミンの不足が病因とされている。これを克服するため、死亡胎児の黒質神経細胞塊を移植する治療が行われていた。現在は、あまり行われておらず、ドーパミン作動薬を中心とした薬剤療法が取られている。しかし、もし自分の神経幹細胞を使った黒質神経の再生が可能となれば、どんなに良いものだろうか。

上記の胎児脳からの移植は、胎児脳には増殖し、機能する神経細胞があるという結果である。当然のことながら、発生期には、増殖し、様々な細胞に分化できる細胞群が存在する。したがって、発生期における分化、未分化、増殖、増殖停止のスイッチを探ることが夢をかなえるための第1歩となることは間違いない。

神経管の発生

神経管は神経発生を理解するのに、とても簡便である。未分化神経細胞群は、神経管の内側に領域され、分化、増殖停止した成熟神経細胞は神経管辺縁部へと移動し、成熟神経群のみの領域を作る。したがって、領域的な解析が可能であり、その解析にて神経細胞の分化、増殖、移動の3点の同期的解析が可能となる。

過去の様々な研究より、中枢神経を構成する神経細胞は、神経板を構成する神経上皮細胞から空間的、時間的に正確に現れてくることが示されてきた。正確に空間的、時間的に調節された神経細胞の多様性は、中枢神経系の構成様式の根本であり、発生の初期段階に始まる精緻な神経回路網の組み立て、さらには脳機能発現のための根幹をなすものである。

脊椎動物の中枢神経系の神経組織は、まず神経板として、Hensen's 結節および中軸中胚葉の作用により外胚葉組織から発生する。神経板を構成する神経上皮細胞は細胞分裂を繰り返し、神経板は形態変化して神経管を構築し、その後神経上皮細胞から細

胞分裂を終えた細胞が成熟神経細胞へと発生する。

運動神経の発生

運動神経は、中枢神経系の最終共通路として位置づけられた中枢神経系の運動系機能発現に最も重要な役割を演じる神経細胞群である。運動神経は、神経管腹側に隣接する脊索、そして後の発生段階において神経管腹側正中線上に位置する底板により、その発生が誘導されることが知られている (Yamada et al., 1991)。脊索、底板から、隣接する神経上皮細胞に働きかける、細胞外分泌因子の存在が予想されていたが、長い間不明であった。しかし、*Shh* がハエのさまざまな器官発生に關与する Hh の相同分子として単離され、様々な実験から運動神経の発生に必要な十分な存在であることが示された (Echelard et al., 1993)。 *Shh* は腹側より、濃度勾配を形成していると考えられており、その活性の度合いにより、様々な種類の運動神経が形成される。

介在神経の発生

運動神経は腹側 *Shh* の影響を受け、神経管背腹軸の、より腹側に発生する。それに対して、介在神経は背側蓋板の影響を受け、背側に誘導される。蓋板には、*Wnt-1*、*Wnt-3a* が発現し、これらの変異マウスを用いた解析より、背側介在神経の維持に必要であることが示されている (Muroyama et al., 2002)。また、BMP, -7 も蓋板に発現し、活性型受容体や不活性型受容体、BMP の強制発現により背側介在神経に必須であることが示されている (Lee et al., 1998)。BMP は *Msx-3* を神経管背側に誘導し、*Msx-3* 介在神経マーカーである Lh2A,B、Islet1 を誘導する (Liu et al., 2004)。*Wnt-1*、*-3a* の 2 重変異マウスでは蓋板自体は残されたままで、Lh2A 等の背側介在神経の消失が起きている。しかしながら、この 2 重変異マウスでは蓋板の構造、および BMP の発現に変化はみられない。よって、考えられることは、*Wnt-1.3a* が蓋板 BMP を介さず、*Msx-3* を誘導し、背側介在神経の発生を制御しているということ、あるいは *Msx-3* の誘導には *Wnt-1*、*-3a*、BMPs が必要であるということが考えられる。このことから、Wnts と BMPs のシグナルクロストークが、介在神経発生に重要であることが予想される。

神経前駆細胞維持

1) Wnt

運動神経や介在神経は発生期の神経管内側に存在する神経前駆細胞 (幹細胞) から分化する。この神経前駆細胞とは、細胞分裂によって自己複製を繰り返し、また未分化性を維持している細胞群である。

Wnt は古くから細胞分裂活性化因子 (mitogen) として知られており、神経管においても上記の背側介在神経誘導に加えて、神経前駆細胞維持に働いている (Megason

and McMahon, 2002)。Wnt シグナルは、 *catenin* を介して、 *Lef1* を介して転写活性を制御する古典的な機構と非古典的な JNK や PKC を介する経路が知られており、それらは独立に、また協調的に働いている (Huelsken and Behrens, 2002)。現在までに、神経管においては *Wnt-1* が神経前駆細胞に *CyclinD1* を誘導し、細胞分裂を維持していることがあきらかとなっている。また、古典的経路 *catenin* は *Tcf1* と結合し、直接 *CyclinD1* の転写制御領域に結合することも明らかとなっている (Hecht et al., 2000)。また、Wnt シグナルは *NRSF* を介して神経分化を積極的に抑制していることも明らかにされた (Nishihara et al., 2003)。

NRSF/REST (*Neural restrictive silencing factor/Repressor element-1 silencing transcription factor*) は神経特異的遺伝子群をクロマチンレベルで染色体構造的に抑制する因子である。また、*NRSF* の N 末側には *mSin3A*, *HDACH1/2* が結合する (Grimes et al., 2000)。 *NRSF* の標的制御は 22 塩基からなり、この標的を持つものには、NGFをはじめ 40 種以上が報告されている (Tabuchi et al., 2002、Palmet al., 1999)。また、*NRSF* 変異マウスは胎生致死であり、成熟神経細胞に特異的な *tublin* 遺伝子の異所的な発現等が観察されている (Chen et al., 1998)。つまり、Wnt シグナルは 1) 細胞周期の維持 2) 神経分化に関わる因子群の転写抑制により神経前駆細胞を維持している。

2) BMP

一方、BMP シグナルはどうか。BMP は *Msx-3* と同様に、 *Msx-1* を誘導する。 *Msx-1* も *Msx-3* と同様に神経管背側に発現している。しかし、 *Msx-1* は介在神経の誘導能を持っていないが、 *Msx-1* は神経分化を抑制する (Liu et al., 2004)。また、活性型 BMP 受容体の神経幹細胞特異的発現によるトランスジェニックマウスが作成され、このマウスの神経管では、本来蓋板のみに発現する *Wnt-1* が神経前駆細胞にも発現し、Wnt シグナルを増強していた。これらのことから、BMP は、 *Msx-1* を介して *Wnt-1* を誘導し、独立にあるいは協調的に、神経分化を抑制していることがわかる。

Notch シグナルと神経前駆細胞

神経前駆細胞とは、上記したとおり未分化性を示す細胞群である。 *NRSF* は神経分化を推進する因子群を抑制するものであり、その結果未分化能を維持する。しかしながら、神経幹細胞/神経前駆細胞の維持機構にはまだ多くの謎があり、様々な方面から精力的な研究が続いている。その中でも、Notch シグナルは神経幹細胞/神経前駆細胞の維持に深く関わっている。

Notch シグナルの研究はハエの翅に刻み目 (ノッチ) の入る変異体の解析から同定され、現在では様々な細胞組織の運命決定に必須なシグナルである (Artavanis-Tsakonas et al., 1999)。Notch 遺伝子は、一回膜貫通型の受容体であ

り、リガンドとして *Delta* や *Serrate* がある。これらリガンドも一回膜貫通型である。リガンド結合後、*Presenilin* により Notch 受容体の細胞内部分が切り切り離され、その細胞内ドメインは DNA 結合型転写因子 *RBP-jk* と結合し、核内に移行する (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994)。核内 Notch 細胞内ドメイン/*RBP-jk* 複合体は DNA に結合して標的遺伝子の転写を活性化する。脊椎動物においては、直接の標的として Hes-1、-5 遺伝子が知られており、これらは強力にプロニューラル遺伝子群、神経分化因子群の転写を抑制する (Jarriault et al., 1995)。

脊椎動物相同因子 *Notch1* の変異マウスは胎生 11.5 日において、胎盤、血管形成異常で死亡する (Swiatek et al., 1997)。また、*RBP-jk* も同様に、10.5 日で死亡する。どちらの変異マウスにおいても神経分化が亢進している。特に、*RBP-jk* 変異マウスでは、神経幹細胞自体の存在が消滅し、*Notch1* 変異マウスより採取した脳組織では神経幹細胞の数が大幅に減少している (Oka et al., 1995)。これらのことから、*Notch1* は神経分化に多いに関与していることが明らかである。

神経管発生における Wnt シグナルと Notch シグナル

Notch1 は神経前駆細胞に発現している。また、活性型 *Notch1* の強制発現では *NRSF* を誘導し分化が停止し、*CyclinD1* を誘導して細胞増殖を激しく繰り返す (Nishihara unpublished data)。さらに、VP16 転写活性化領域融合型 *RBP-jk* も同様に、*NRSF* と *CyclinD1* を誘導する。前述したが *Wnt-1* は *NRSF* と *CyclinD1* を誘導する。したがって、Wnt と Notch の両者は同一の方向性をもって、神経前駆細胞を維持しているようである。これらの関係には、いくつかの報告がある。Wnt シグナルが、Frizzled 受容体を介して細胞内へ伝わりと、*catenin* を分解する *GSK3* を不活化する。*GSK3* は Wnt シグナルが OFF の場合、*catenin* をリン酸化し、その分解を促進する (Nusse, 1999)。最近、*GSK3* が *Notch1* 細胞内ドメインをリン酸化し、不活化することが報告された (Espinosa et al., 2003)。つまり、Wnt シグナルが ON の状態は、*GSK3* が不活性な状態で、*catenin* と *Notch1* 細胞内ドメインは安定化できる。よって、これらのシグナルはともに核内へ流れる。このことから、Wnt と *Notch1* シグナルは密接に関わっていることがわかる。

神経管発生における BMP シグナルと Notch シグナル

BMP シグナルが神経前駆細胞からの neuron / glia 選択に関わるという知見がある。BMP シグナル下流転写因子 *Smad1* が *STAT3* と結合し、GFAP 転写制御領域に結合する。しかし、*Neurogenin* 存在下では、*Smad1* は *STAT3* から離れ、*Neurogenin* と結合することで、*NeuroD* 等の転写を活性化し、neuron 分化を促進する (Nakashima et al., 1999, Sun et al., 2001)。また、さらに前段階での BMP の役割については、*Nestin* プロモーター制御下の活性型 BMP 受容体発現マウスで解析された。結果は、神経上皮全体が、

Choroid Plexus や蓋板のマーカ―を出し、BrdU の取り込みが上昇した (Panchision et al., 2001)。通常、Choroid Plexus や蓋板は、BrdU の取り込みが神経上皮に比べて低い。したがって、この実験は、過剰な BMP シグナルを流した結果であり、間接的な状況を見ているという域を出ないものである。よって、in vivo において BMP と神経幹細胞/神経前駆細胞の関係を示し、解析した知見は皆無に等しい。

本研究では、BMP と Notch の関係に注目し、未分化、分化機構に BMP がどのように関与するか、核内 BMP 抑制因子 *Dach1* を用いて解析を行った。そして、BMP シグナルの抑制的な役割が、神経を前駆細胞の段階に維持し、また成熟神経細胞の細胞増殖、脱分化を抑えていることが明らかとなった。

結果

Dach1 は神経上皮細胞群を誘導する

前項より、BMP シグナルと *Dach1* は密接に関わっていることが明らかであり、また第 2 部より、その発現領域においても重複している部分が多いことがわかっている。それでは、神経管ではどうだろうか。BMP は神経管閉鎖前から、背側神経上皮層 (将来は蓋板になる領域) に発現する (Data not Shown)。その後、蓋板が形成されるとその発現は限局し、発生が進むと発現は弱まっていく (図 19A,D)。一方、*Dach1* は神経管後の St14-15 に神経上皮に発現し、その発現は生後の神経幹細胞へと繋がっていく (図 19C,F)。St16 では蓋板を除く、神経上皮、*Notch1* 陽性の神経前駆細胞層、腹側運動神経部分に発現しており、その後、St19 になると、その発現は *Notch1* で表される神経前駆細胞層 (VZ; Ventricular Zone) に集約してきた (図 19 F)。BMP シグナルは少なくとも神経管の DV 軸中央部まで影響を及ぼしている (Timmer et al., 2002)。このことは、蓋板以外の神経管に発現している *Dach1* が BMP 抑制因子として機能する可能性を示している。

そこで、*Dach1* を St14 神経管にエレクトロポレーションを用いて強制発現し、48 時間後 St24 にて切片を作成し、神経前駆細胞マーカ― (*Notch1*) と神経マーカ― (*tublin*) でその結果を観察した。EGFP で導入された細胞群を見ると、VZ および成熟神経細胞層 (MZ; Mantle Zone) に導入されていることが確認できる (図 19I)。また、エレクトロポレーション法は、片側にのみ DNA を注入することができるため、左側がコントロールとなる。*Notch1* で染色したところ、右側 MZ に *Notch1* 陽性で、*tublin* 陰性の細胞群が異所的に出現していた (図 19G,H)。しかし、VZ に変化はみられなかった。GFP で導入細胞を観察すると、VZ と MZ の両方に導入されていることがわかる。この結果から、MZ に導入された異所的 *Dach1* は MZ において、神経前駆細胞を誘導したと考えられた。

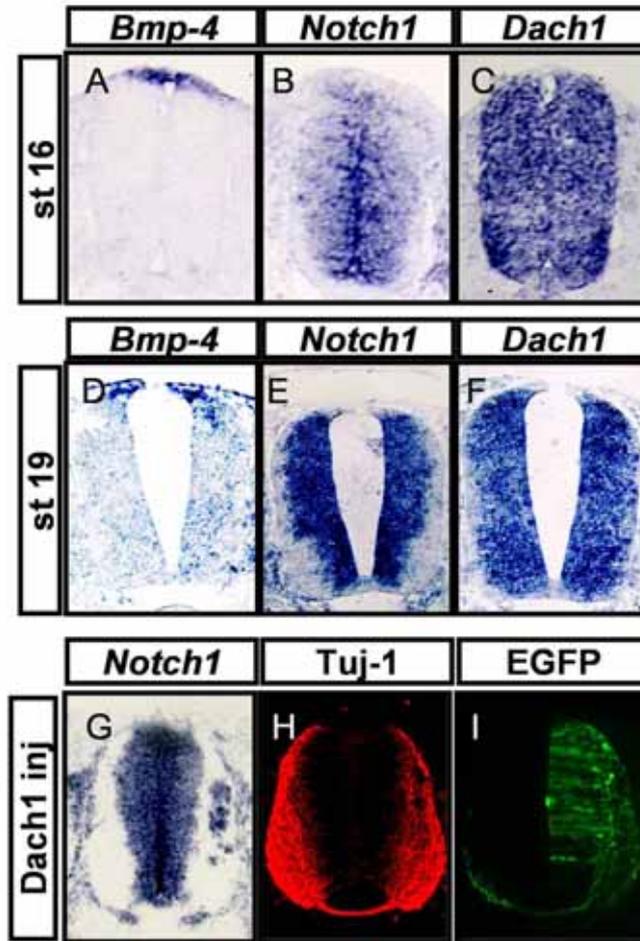


図 19 神経管における *Bmp-4*、*Dach1* の発現と *Dach1* 強制発現
 (A-C) St16 において、*Bmp-4* は蓋板に発現し、*Dach1* は神経管全体に分布している。神経前駆細胞は *Notch1* 陽性の神経管内側に存在していた。(D-F) St19 では、*Bmp-4* は同じく蓋板に発現がのこり、*Dach1* の発現は、*Notch1* 陽性の VZ に強くなってきた。(G-H) St14 - 16 神経管に *Dach1* を強制発現させ、48 時間後に *Notch-1* で染色した。MZ に *Notch* 陽性の細胞群が出現していた。この細胞群は、*tublin* 陰性であった。I は共導入した EGFP の写真。

Dach1 は神経上皮細胞群の誘導、維持に必須である

次に、*Dach1* のドミナントネガティブ型を用いて、*Dach1* の機能を障害し、その結果神経上皮がどのような変化を見せるか検討した。神経管に *VP=Dach1* を強制発現させると、24 時間後に *Notch1* は劇的に、その発現が消失した (図 20A)。橙色は、導入したリコンビナント *Dach1* の mRNA 発現を表している。導入細胞を橙色で染色し、*Notch1* を青で染色したところ、強制発現細胞が自律的に *Notch1* mRNA の発現を減少させており (図 20D-F)、しかもそれら導入細胞は塊となり、*Notch1* の発現する VZ から排出されていくように見えた (図 20G-I)。また、導入細胞を EGFP に観察したところ、細胞同士が塊となった様相を見せ (図 20B)、これは *Dach1* を強制発現した場合には見られない現象であった。12 時間後では、まだ神経管に一様な発現が見られるが、24 時間後では、ブロック状に分かれていき、48 時間後には数個の塊として見られた (図 20D-I)。12-48 時間と時間を経ると、その発現する細胞数が減少していた。

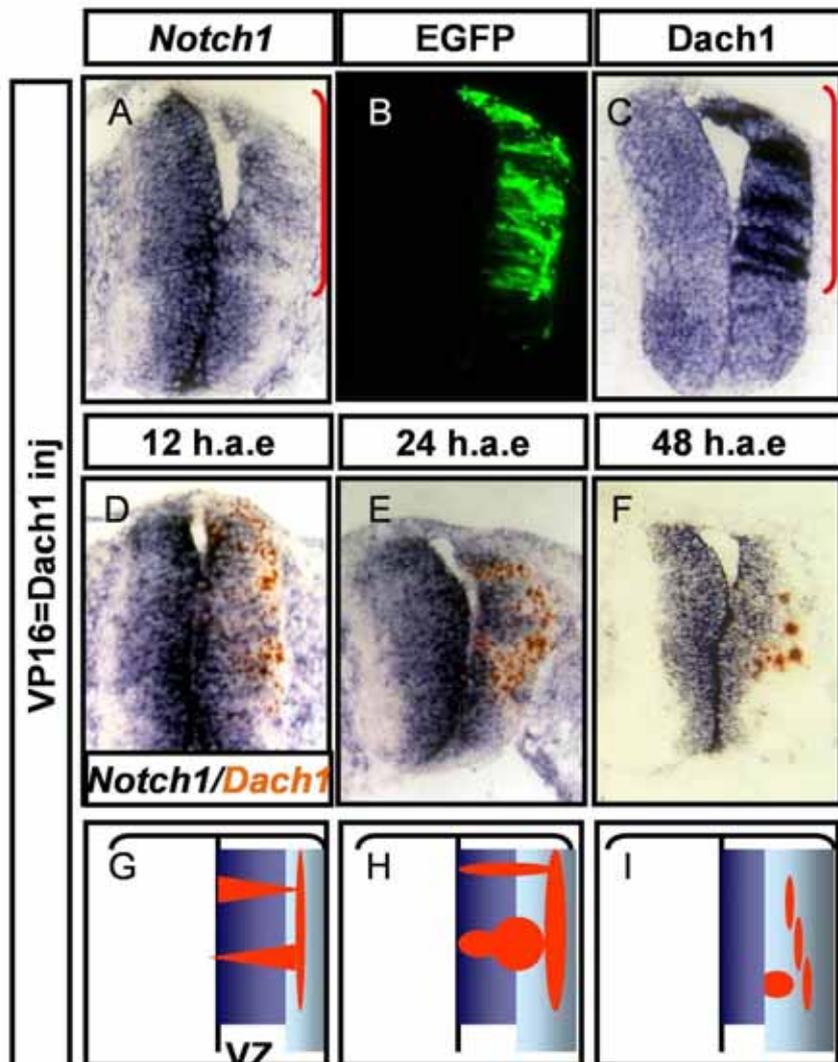


図 20 機能阻害型 *Dach1* の強制発現

(A-C) 24時間後における *Dach1* 機能阻害型 (*VP=Dach1*) の強制発現により、*Notch1* の発現が消失した。Bは共導入したEGFP。Cは導入された *VP=Dach1* の発現状態 (D-F) 導入後12時間から24時間後に、橙色で表される導入細胞内で、*Notch-1* が消失した。48時間後では、導入細胞がMZに排出されていた。(G-I) 導入細胞を赤色で表し、*Notch1* を濃紺で、MZを淡青で色付けした。導入細胞は、塊となって、MZに排出され、消失していった。

また、*Pax6* や *Pax3* で表される背側 VZ が特に、形態的な変化が生じており、神経前駆細胞マーカーである *Neurogenin2* の染色細胞も減少していた (図 21A, B, D)。おそらく、導入された部分は *Notch1* が消失し、細胞増殖を停止したため、必要な神経細胞を作れなくなったためと考えられる。さらに、48 時間後では、かなり橙色で染色される細胞数が減少していることより、自律的な細胞死が起きている可能性もある。しかし、TUNEL 染色をした限り、優位なアポトーシス反応は観察できなかった (Data not Shown)。次に、成熟神経のもっとも初期のマーカーである *Islet1* で染色したところ、導入部位に異所的な *Islet1* 陽性細胞が見られた (図 21E)。正常な *Islet1* はこの部位に発現するが、その発現はもう少し進んだステージであり、左側と比べると優位に、早く発現してきたことがわかる。したがって、導入細胞は *Notch1* の発現を減少し、神経前駆細胞の次段階へ分化したと考えられる。しかし、*Tublin* 等の神経成熟マ

ーカーでみると、その発現はすこし、減少しているように見えたが、細胞自立的に、有意な増加、減少しているものではなかった(図 21F)。これらの結果は、*Dach1* の MZ における異所的は強制発現により、神経前駆細胞の状態 (*Notch1* 陽性) を誘導することが可能であり、また *Dach1* の機能障害により、VZ での *Notch1* の発現を消失し、神経前駆細胞としての状態を、成熟神経細胞の初期段階へと移行させることが明らかとなった。

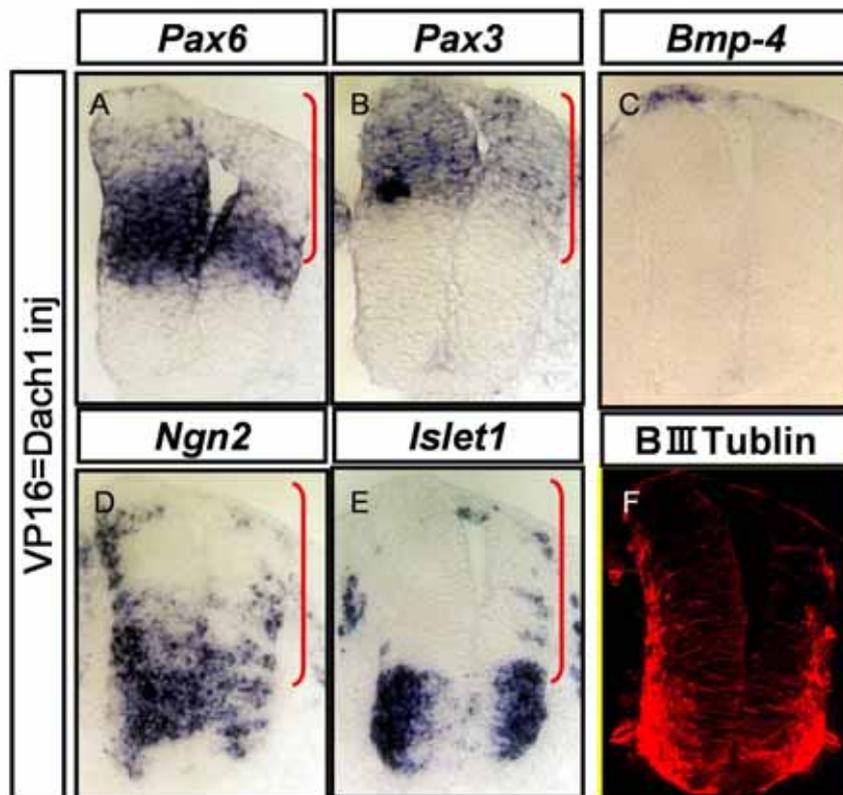


図 21 機能障害型 *Dach1* の強制発現

(A-C)24時間後における *Dach1* 機能障害型 (*VP=Dach1*) の強制発現により、VZ での *Pax6*、*Pax3* の発現が消失したが、蓋板を表す BMP の発現は上昇しなかった。(D-F) 未熟神経細胞である Neurogenin2 陽性細胞が減少し、*Islet1* 陽性の初期成熟神経細胞が増加したが、tublin 陽性の成熟神経は増加していなかった。

BMP シグナルは *Notch1* 陽性神経前駆細胞を制御する

BMP 活性型受容体の強制発現では、*Pax6* や *Pax3* の腹側境界線が、より腹側へシフトするなど、DV 軸に変化が見られる。しかし、神経上皮、特に *Notch1* の発現等による、神経前駆細胞の変化は、いまだ見られていない。そこで、*Bmp-4* を神経管に強制発現し、変化を見ることにした。BMP は背側より濃度勾配を形成していると考えられている。よって、内因性の濃度勾配を考慮しないようにするため、より腹側のみに BMP を導入した(図 22A-C)。すると *Notch1* の発現消失が見られた。また、BMP 誘導性の背側介在神経マーカーである *Lh2B*、*Islet1* の異所的な誘導がおきており、導入した *Bmp-4* が機能していることがわかる(図 22C)。次に *Notch1* の発現に伴い、何がその

部分に進出しているのかを様々なマーカーで見たところ、*Meis-1*の発現上昇が見られた。

次に、神経管に発現していない *Noggin* を強制発現させることで、BMP シグナルの必要性をみたところ、*Noggin* により、MZ において *Notch1* の異所的な発現が見られた(図 22D,E)。24 時間後において、VZ の外側に異所的な *Notch1* 陽性細胞が現れ、48 時間後でも MZ に *Notch1* 陽性細胞が見られた。しかし、*Meis-1* の発現に大きな変化は見られなかった (Data not Shown)。これらのことから、BMP シグナルは VZ において、*Notch1* 発現維持のため、その効果が抑えられている必要があり、逆に、MZ では異所的な *Notch1* の発現を抑えるため、ON の状態になっている必要があると考えられる。また、*Meis-1* は BMP により発現誘導される。この時期の神経管における *Meis-1* は背側において VZ と MZ の境界領域 (IZ; intermediate zone) に発現する(図 22B)。よって、BMP により *Notch1* 陰性となった VZ は、*Meis-1* 陽性となり IZ の表現型を示していると考えられる。

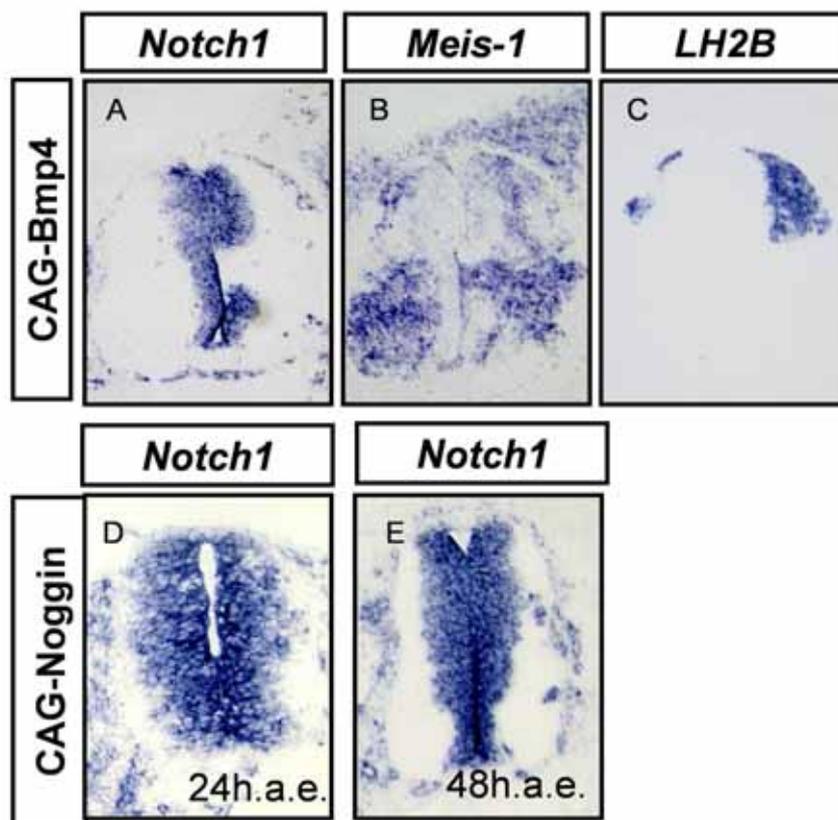


図 22 BMP、あるいはNogginの強制発現

(A-C)48時間後における *Bmp-4* の強制発現により、VZ での *Notch1* の発現が減少し、*Meis-1* の発現が増加していた。 *Bmp-4* は *Lh2B* を細胞非自律的に誘導しているため、BMP シグナルが強制的に増加しているのがわかる。

(D,E)BMP 抑制因子である *Noggin* を導入すると、*Dach1* 強制発現と同様に MZ にて *Notch1* 陽性細胞群が現れた。

Dach1はMeis-1を制御する

*Bmp-4*の強制発現で、*Notch1*が減少した。これは、機能阻害型 *VP=Dach1*の強制発現と同様な結果である。では、*VP=Dach1*で *Meis-1*の発現に変化が見られるのか調べた。すると、細胞自立的に *Meis-1*の発現上昇が認められた(図23A)。したがって、BMPによる *Notch1*の発現消失と *Meis-1*の発現上昇は、*VP=Dach1*強制発現と同じ現象である。一方、*Meis-1*は、腹側では運動神経に発現しており、この発現は *Dach1*と重複している。しかし、背側においては、*Dach1*はVZに強く、*Meis-1*はIZに発現している(図22B)。そこで、*Meis-1*が *Dach1*に及ぼす影響を見るため *Meis-1*を神経管に強制発現した。結果、導入部分(図23F)において、*Notch1*の発現は減少し、また *Dach1*発現も減少していた。これらの結果から、*Dach1*は *Meis-1*の発現を抑制し、一方 *Meis-1*も *Dach1*の発現を抑制していることが明らかとなった。しかしながら、*Meis-1*による *Notch1* mRNA 抑制は、*Dach1* mRNA 転写抑制よりも、顕著で明確であることから、*Dach1* 転写抑制は2次的なものであるかもしれない。以上より、BMPシグナルは *Notch1*を負に制御し、そのメカニズムには *Dach1*が関係し、また IZに発現する *Meis-1*との抑制的相関によって、神経管内での層構築に関与すると考えられる。

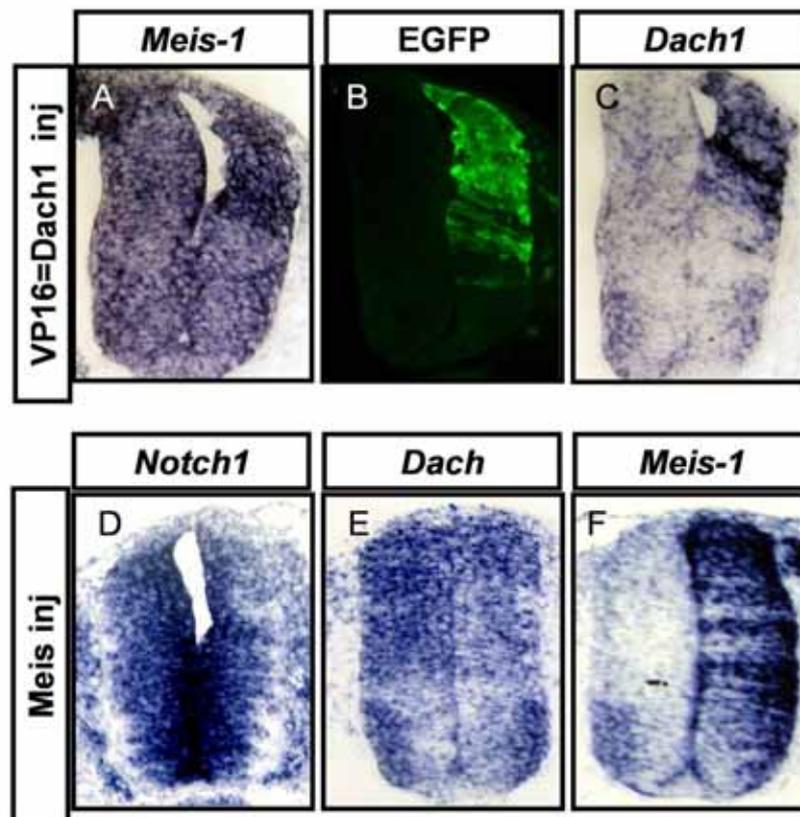


図23 機能阻害型 *Dach1*、*Meis-1*の強制発現

(A-C)24時間後において、*Dach1*機能阻害型 (*VP=Dach1*)の強制発現により、*Meis-1*の発現が上昇した。内因性のシグナルはIZおよび腹側MZに見られる(後はバックグラウンド) Bは共導入したEGFP。Cは導入された *VP=Dach1*の発現状態 (D-F)24時間後における *Meis-1*の強制発現。*Notch1*、*Dach1*が細胞自立的に減少していた。Fは導入された *Meis-1*の状態。

考察

BMP シグナルと神経前駆細胞

Bmp-4 強制発現により、神経前駆細胞が *Notch1* の発現を消失し、*Meis-1* の発現が上昇した。*Meis-1* および *Meis-2* は、肢芽において近位部を形成する因子である。そして、肢芽においては BMP シグナル依存の *Dach1* シグナルと *Meis-2* は、相補的な役割で肢芽遠近軸の形成に関与している。神経管では、*Meis-1* は腹側運動神経と背側の IZ に発現し、*Dach1* は腹側運動神経と背側 VZ に発現する。BMP シグナルを抗リン酸化 *Smad* 抗体（抗 *P-Smad* 抗体）で染色してみると、背側においては、VZ、IZ の両方に染色される（図 24B）。*Dach1* は、リン酸化 *Smad* に結合し、その標的遺伝子の転写を抑制するため、背側 VZ においてその役割を果たすことは十分考えられる。したがって、*Dach1* は背側 VZ において、BMP シグナルを抑制し、*Notch1* の維持に働いていると考えられる。

Dach1 の強制発現により、MZ において異所的な *Notch1* が誘導される。*Wnt-1* の神経管への導入の場合も *Notch1* が誘導されるが、VZ 領域の拡大として表現される（Megason and McMahon, 2002）。したがって、MZ における、異所的な *Notch1* 誘導は起こらない。*Dach1*、および BMP シグナルの抑制によって生じた MZ での *Notch1* 陽性細胞は、成熟神経細胞を脱分化させた可能性がある。これは、将来の神経細胞再生への大きな一歩である。

また、抗 *P-Smad* 抗体の染色では腹側 MZ にも見られる。これは、*Noggin* 強制発現により、MZ において異所的に現れた *Notch1* の結果を裏づけするものである。この染色から、BMP シグナルは背側のみに流れていると考えられていた従来のコンセンサスを覆す結果であり、*Noggin* による *Notch1* 誘導もその証拠の 1 つとなった。つまり、蓋板の BMP や他の TGF- β ファミリーは神経管において、*Dach1* と *Meis-1* の相補的な発現、働きにより *Notch1* 発現の VZ を維持すると考えられる（図 24A-E）。

しかし、神経管に影響する BMPs のソースは蓋板だけであるかと考えると、必ずしもそうではない。蓋板を含む神経上皮に限ってみれば、蓋板のみに様々な TGF- β 系分泌因子が発現している。しかし、BMP ソースは神経管に隣接する体節にも発現している。したがって、神経管腹側 MZ での抗 *P-Smad* 抗体による染色は、神経管外部からの BMP シグナルをあらわしているのかもしれない。また、背側神経管の VZ の発現境界についても、なぜ残されている。背側からの BMP シグナルが、なぜくっきりとした境界をつくり、抗 *P-Smad* 抗体の染色結果として現れるのか。肢芽などで見つかった分泌性 BMP 抑制因子は、神経管に発現していない。したがって、BMP シグナルにおいての、上流（*Smad* のリン酸化を阻害する）に位置する BMP 抑制因子の解明が必要であろう。

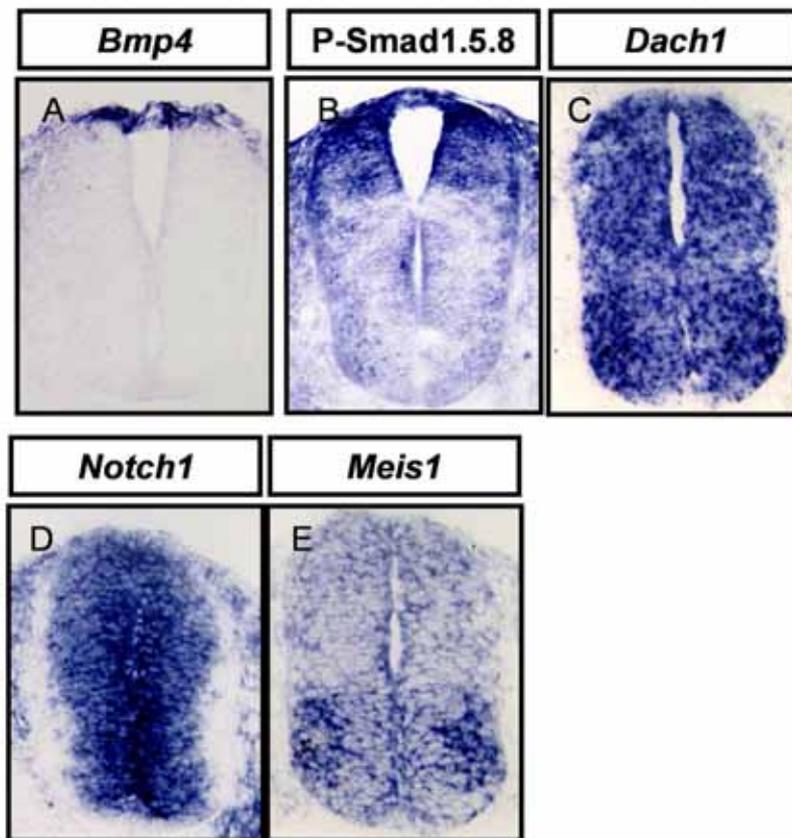


図 24 機能阻害型 *Dach1*、*Meis-1* の強制発現

(A-E) St19 における発現様式。蓋板に発現する BMP のシグナルは、*Smad1/5/8* のリン酸化抗体により染色され、背側 VZ、IZ、その他 MZ にシグナルが伝わっているのがわかる。その領域は、背側において *Dach1*、*Notch1* と重複し、*Meis-1* とは重ならない。

腹側神経管

一方、神経管 DV 軸形成に BMP と相対する腹側因子がある。Shh シグナルは、腹側底板より神経管に流れており、下流に *Gli1.2.3* を使用する分泌性誘導因子である。また、*Gli3* は活性型として、転写抑制能を示す。腹側 VZ においても *Dach1* は発現している。そして、*Notch1* も発現している。*Dach1* 強制発現により腹側にも *Notch1* 誘導、*VP=Dach1* により腹側の *Notch1* の消失がみられることから、腹側における *Dach1* の機能も、*Notch1* の維持であることは間違いない。

Dach1 を用いた Two-hybrid による結合蛋白をサーチした結果、Shh シグナル下流転写因子 *Gli2* と結合する可能性が見られた (Data not Shown)。また、免疫沈降法にて、*Dach1* が *Gli1*、2、3 とともに結合が認められた (Data not Shown)。したがって、*Dach1* は神経管腹側においては、BMP ではなく Shh シグナルに関与する可能性が考えられる (図 25)。

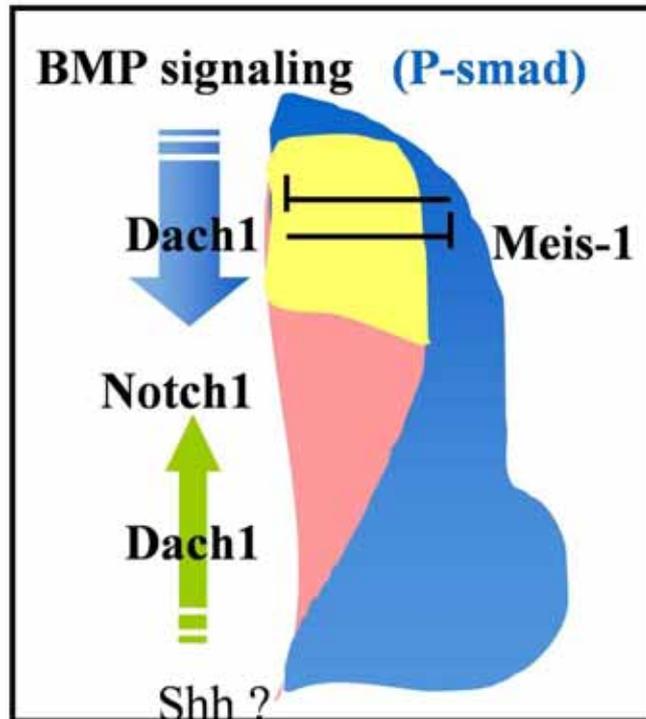


図 25 *Dach1*、*Meis-1*による*Notch1*の制御

BMPシグナルに反応した*Dach1*は、背側にて*Meis-1*と抑制し合いながら、*Notch1*の発現を維持する。腹側では、*Dach1*は、*Shh*などのシグナルにより*Notch1*を維持しているのかもしれない。

また、*Meis-1*と*Dach1*は腹側では、ともに成熟運動神経に発現しており（図 24）、前脳においては、*Dach1*、*Meis-1*はともに*Pax6*の発現する背側VZに発現している（Machon et al., 2002 and Gunhaga et al., 2003）。したがって、この領域においては、肢芽や背側神経管で得られた*Dach1*と*Meis-1/2*の関係は成り立たない可能性がある。*Meis-1/2*は、DNA結合能を持つこと（Zhang et al., 2002）や、コファクターとして働いている場合（Shen et al., 1999）など、様々に報告されている。また、*Dach1*はコファクターであり、結合する転写因子により、あるいは*Dach1*コファクターに結合する補助因子によって転写活性を変える可能性がある。最近では、DNA結合型*Six6*に*Dach1*がコファクターとして結合し、p27の転写を抑制していると報告された（Li et al., 2002）。よって、*Dach1*と*Meis-1/2*はともに状況に応じた活性を示すことが予想され、その標的も様々であることが予想され、実際、多くの標的が推測されている。

神経幹細胞

成体には、神経幹細胞は様々な領域に存在していることが知られつつある。代表的なものは、前脳の第3脳室壁のSub-ventricular zone（SVZ）に存在し、嗅球へ移動し続ける細胞がある。この細胞群を、成体神経幹細胞と位置づけ、どのようなmRNA

の発現があるか調べた結果、*Meis-2* の発現が確認されている (Pennartz et al., 2004)。また、*Dach1* と *Notch1* も成体神経幹細胞に発現している (Machon et al., 2002)。この状況に応じた *Dach1* と *Meis-1/2* の相関を調べていく必要があるだろう。*Dach1* や *Meis-1/2* に代表されるコファクターは、様々な状況で多くの転写に関わっている。最近では、*Meis-1* を含む複合体が、転写活性の起こる前段階でゲノム上に結合している状況があると報告された。筋分化において、*MyoD* は *Myogenin* を誘導する。このとき、*MyoD* は *Myogenin* の転写制御領域に結合するが、実は DNA に直接ではなく、先に結合していた *Meis-1/2* に結合すると報告された (Berkes et al., 2004)。このことから、*Meis-1/2* や、あるいは *HDAC* と結合する *Dach1* はクロマチンリモデリングに関わる可能性も考えられる。また、VZ に発現し神経分化を抑制する *NRSF* は、クロマチン制御因子であることなどから、神経幹細胞とクロマチンを介した制御は今後大きな役割を占めるだろう。

神経管の形態形成、層構築

神経幹細胞/神経前駆細胞の特徴のひとつに、細胞周期の進行がある。発生期の神経管では、蓋板に発現する *Wnt-1* が *CyclinD1* を直接誘導する。*Wnt-1* 強制発現の際、VZ 領域の拡大が生じ、このことから McMahon らは、*Wnt-1* が蓋板に発現し、背側からの濃度勾配が、背側 VZ が腹側 VZ に比べて領域的に広い理由であると考えた (Megason and McMahon, 2002)。ただし、活性型 *catenin* を神経管に強制発現させると、MZ に異所的な *Notch1* 陽性細胞が現れる (Data not Shown)。このことは、やはり *Wnt-1* シグナルは VZ のみに流れており、MZ においてその反応性を失っている、あるいは MZ のみに *Wnt-1* 抑制因子が発現している可能性を示している。

Noggin による BMP 抑制や、*Dach1* により、MZ に *Notch1* 陽性細胞が現れたことは、VZ においての領域拡大をとまなう細胞周期の増加を誘導しないということを表している。一方 *VP=Dach1* の強制発現で、細胞挙動に異常が生じていた。この現象は、*Wnt-1* の下流シグナルである *Lef1* の機能阻害型の強制発現でも見られている (Data not Shown)。したがって、この点において *Dach1* と *Lef1* (古典的 Wnt シグナル) の作用点は同じと考えられる。

以上、これら 2 つのシグナルは同じ蓋板から流れ、BMP では *Wnt-1* を誘導できる。しかしながら、その作用点には、「ずれ」があることもわかってきた。これら 2 つ、あるいはその他のシグナルをさらに考慮していくことが、神経管形成の理解に繋がると考えられる。

第2部

Daam 遺伝子による平面内細胞極性から見た神経組織発生 序

生物のからだには、様々な非対称性が存在する。脊椎動物での内臓の配置や、組織内における細胞の配置、さらには細胞内での骨格類の重合方向など、多種多様に非対称性は見受けられる。しかし、それらの非対称性がどのようなメカニズムで構築、維持され、また再編成されるのか、その多くはいまだ未解明である。無脊椎動物を用いた研究から1つのコンセプト Planer Cell Polarity (PCP) が提唱された (Adler, 1992, Gubb, 1993, Ma et al., 2003)。PCP シグナルはハエの翅においては毛の方向性を規定している。ハエの翅には感覚器官である毛が、必ず遠位方向に向かって生えそろっている。この現象は、実に興味深いものであり、多くのなぞが含まれていた。

ハエの毛は、細胞単位で見ると必ず遠位方向の1つの隅に生える。そして、生えた毛先はかならず遠位方向を向いている。さらに、翅の細胞すべてが、同じように毛を生やす。ここには、1.なぜ、細胞の一部分にのみ毛を生えさせるのか。2.なぜ一定の間隔で毛は生えそろっているのか。3.なぜ、前後左右の細胞群と強調し、毛の生える向き、位置をきめるのか。という疑問が必然的に湧いてくる。

これらの疑問をとく糸口となったコンセプトが PCP である。PCP シグナルは、細胞外や細胞膜上で *Frizzled* (*Fz*) シグナルを受け、下流細胞内因子 *Dishevelled* (*Dsh*) を膜へ移行させ、シグナルが JNK や Rho を介して細胞骨格へと伝えられる (Strutt et al., 1997 and Shulman et al., 1998)。したがって、膜からのシグナルを受けた細胞内の一部分にのみ、細胞骨格が発達し、毛を作る。さらに、これらのシグナルはフィードバックループを形成し、*Dsh* の膜移行をさらに強固なものにし、逆に隣の細胞の膜では、フィードバックループによって *Dsh* が分解され、シグナルが抑制させる (Rawls et al., 2003)。ここには、隣接する細胞膜で漠然とした細胞外シグナル強度の違いが生じていると考えられている。ハエにおいては、インテグリンファミリーに属する *Fat* が、翅遠位側から分泌され、隣接する細胞膜上でのシグナル強度の偏りを生じている (Yang et al., 2002)。つまり PCP シグナルは、組織内で統一的に制御されたシグナルであり、その結果、個々の細胞内での極性を制御することで、組織としての3次元的な構築を行っている。PCP シグナルは、脊椎動物においても同様な分子群を使用し、重要な形態形成を行っており、魚類、両生類においては原腸陥入時の細胞再配列を制御するシグナルであることが解明されつつある (Darken et al., 2002 and Veeman et al., 2003)。

PCP シグナルの分子メカニズム

ハエの翅、ゼノパスやゼブラフィッシュの原腸陥入の解析より、PCP シグナルに関わる多くの分子が同定されてきた。ハエでは最上流因子として *Fat* があり、ゼノパスやゼブラフィッシュでは *Wnt-11* が存在している。細胞膜では Fz を使用しており、この受容体は古くから Wnt 受容体として知られている (Slusarsk et al., 1997)。このことから、PCP シグナルは Wnt シグナルの一部であると考えられている。しかし、重要なことは Wnt シグナルには、現在 3 種類あるということである。1 つは前述したが、古典的 Wnt シグナル (カノニカル Wnt 系) で、その他が非古典的 Wnt シグナル (ノンカノニカル Wnt 系) で、このノンカノニカルの中に PCP シグナルと Ca^{2+} シグナルがある (Veeman et al., 2003)。これら、カノニカルとノンカノニカルシグナルは、お互いを抑制していることが多く知られており、細胞内で使用する因子群もかなり異なっている。しかしながら、Fz 受容体と直下の *Dsh* は共通して使用されている (Ca^{2+} 系には必ずしも *Dsh* は必要ない)。*Dsh* 蛋白質には、3 つのドメインが存在し、もっとも N 末側がカノニカルに必要で、2 つ目が PCP シグナルに必要である。PCP シグナルは、この 2 つ目のドメインである PDZ ドメインに結合する *Daam* を介して Rho ヘシグナルが流れる。

神経発生と PCP シグナル

脊椎動物神経発生では、個々の神経細胞の分裂、増殖、分化が正確に制御され、その結果、脳や脊椎、末梢神経が正しく形作られる。神経発生における、細胞の分裂、配置も、根底に PCP シグナルによる制御を受けていると予想される。なぜなら、PCP シグナルに関与する様々な遺伝子が神経細胞などにも多く発現していることが確認されているからである。脊椎動物神経発生における PCP シグナルの解明のため、*Daam* 遺伝子をニワトリとマウスで単離し、その解析をおこなった。

結果

マウス *Daam1*、*Daam2* 遺伝子の発現解析

Daam (*Dsh associate Dactivator of morphogenesis*) はゼノパスにおいて *Dsh* 結合因子として報告された (Habas et al., 2001)。また、現在までにマウス、ヒトで相同分子が見ついている。我々は、神経系におけるマウス *Daam* 遺伝子群の発現解析を行った。マウス胚において、*Daam1* と *Daam2* は相補的な発現を示した (図 26 *Daam1*, 図 27 *Daam2*)。In situ ハイブリダイゼーションにより *Daam1* は、胚性 10.5 日における、嗅脳上皮層に発現し (図 26A 赤矢頭)、大脳では Mantle Zone (MZ) に細胞数層のライン状にみられ、ganglionic eminence に強い発現が観察された (図 26A)。同じステージにおいて、*Daam2* は nasal process の間充織 (図 27A 青矢頭)。胚性 14.5-16.5 日に、*Daam1* は Intermediate Zone (IZ) と Cortical Plate (CP) の 2 層に発現してい

た(図26B,E)。それに対して、*Daam2*は胚性13.5日の thalamus の Ventricular Zone(VZ)に発現し、胚性15.5日まで持続していた(図27B,C)。このステージにおいて、ganglionic eminence の VZ での *Daam2* 発現が開始し、その発現は腹側に伸長し(図27C,D 赤矢頭)、thalamus の発現はフェードアウトした(図27D)。

さらに拡大して、詳細な解析を行った。胚性14.5日に、*Daam1*は2層の発現が認められ、外側CPの層とVZとCP層の間に発現が見られ、この層は胚性15.5日や胚性16.5日でみるとVZの外側に位置するSubventricular Zone(SVZ)であった(図26E-H)。一方、*Daam2*は胚性15.5日ではlateral ganglionic eminenceにおけるVZにのみ発現していた(図27E)。よって、*Daam1*は脳新皮質およびganglionic eminenceにおいてSVZとCPに発現し、*Daam2*はganglionic eminenceのVZだけに発現する、相補的なパターンを示した。

*Daam2*は、嗅球へながらるVZにも発現し、嗅球が出来始める胚性14日から弱く発現し、胚性14.5日では嗅球最外層(図27F 青矢頭)と嗅球VZ(図27F 赤矢頭)に発現していた。また、これらの発現は、胚性15.5日には、より顕著に見られ(図27G)、生後は消失していた(Data not Shown)。

他の組織においては、胚性14.5日 *Daam1*は嗅脳に発現が見られ、嗅上皮の中間層(図26I 赤矢頭)にみられ、最も内側層には発現が見られなかった(図26I 中の囲い、赤線)。それに対して、*Daam2*は嗅上皮の基底層に発現していた(図27H 青矢頭)。嗅脳においては、未熟な神経細胞は中間層に存在し、前駆細胞は外側基底層に存在していること(Calof et al., 1998)から、大脳における発現様式と同様に、前駆細胞に*Daam2*、成熟前の未熟細胞に*Daam1*が発現していることがわかった。また眼において、*Daam1*は神経性網膜に発現し(図26J)、*Daam2*は神経性網膜とレンズ上皮に発現していた(図27I 青矢頭)。小脳では、*Daam1*はPurkinje細胞層のみに発現し(図26J)、*Daam2*は内顆粒層に発現が見られた(図27J)。

発生期の神経管においては、*Daam1*は胚性10.5日のMZに発現し(図26L)、11.5日では背側MZに強く、腹側にも弱く発現していた(図26M)。胚性14.5日には、神経管MZに広く発現していたが、VZでの発現は見られなかった(図26N)。一方、*Daam2*は胚性10.5日VZの腹側に弱く発現を開始し(図27K)、胚性11.5日では腹側に強く、背側VZに発現していた。これらの発現は*Daam1*と相補的である。胚性14.5日を過ぎると、*Daam2*発現はVZに限局し、またドット状にVZから放射状の発現が認められた。

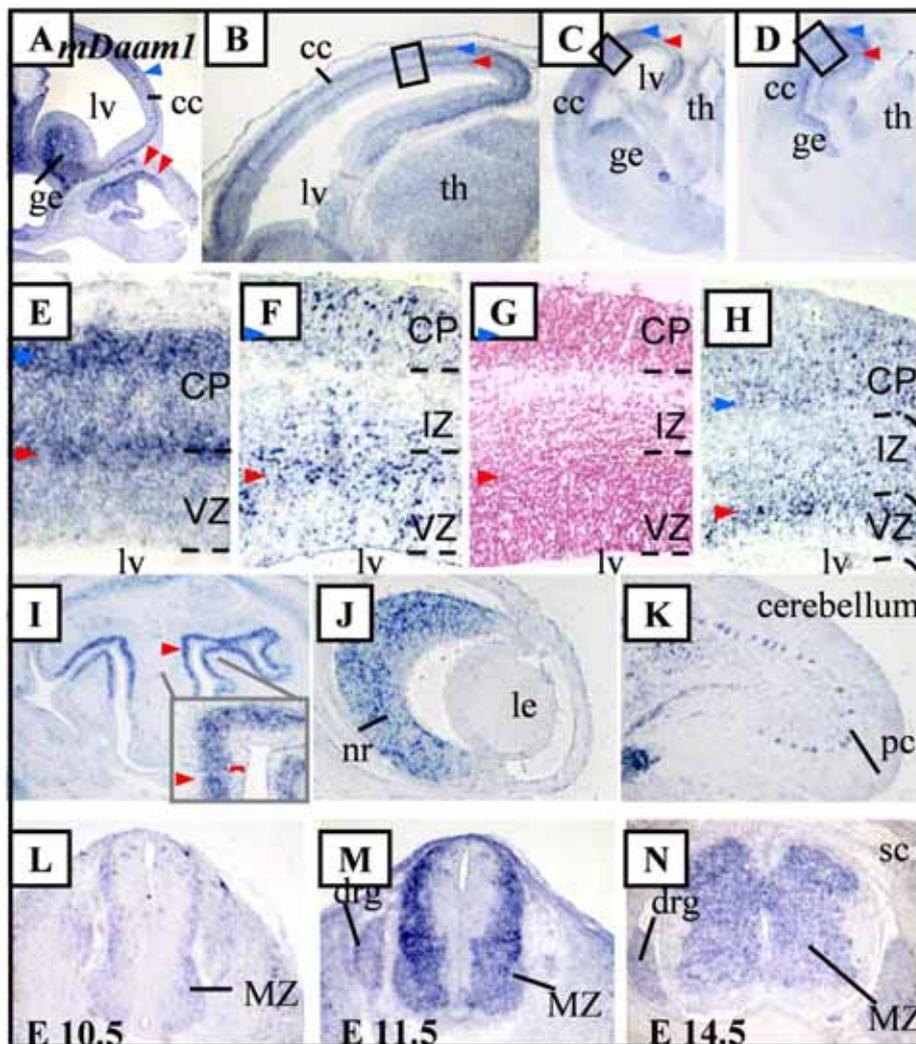


図 26 マウス *Daam1* の発現解析

(A) E10.5 頭部, (B, E) E14.5 日の脳切片, (C, F) E15.5 日の脳切片, (D, H) E16.5 日の脳切片, (G) E15.5 日の HE 染色, (I) E14.5 日の嗅脳 (J) E14.5 日の目 (K) 成体小脳 (L-N) 神経管の切片 色印は本文参照

lv; lateral ventricle, cc; cerebral cortex, ge; ganglionic eminence, th; thalamus, CP; cortical plate, VZ; Ventricular Zoon, IZ; intermediate zoon, nr; neural retina, le; lens, pc; purkinje cell, MZ; Mantle Zoon, drg; dorsal root ganglion

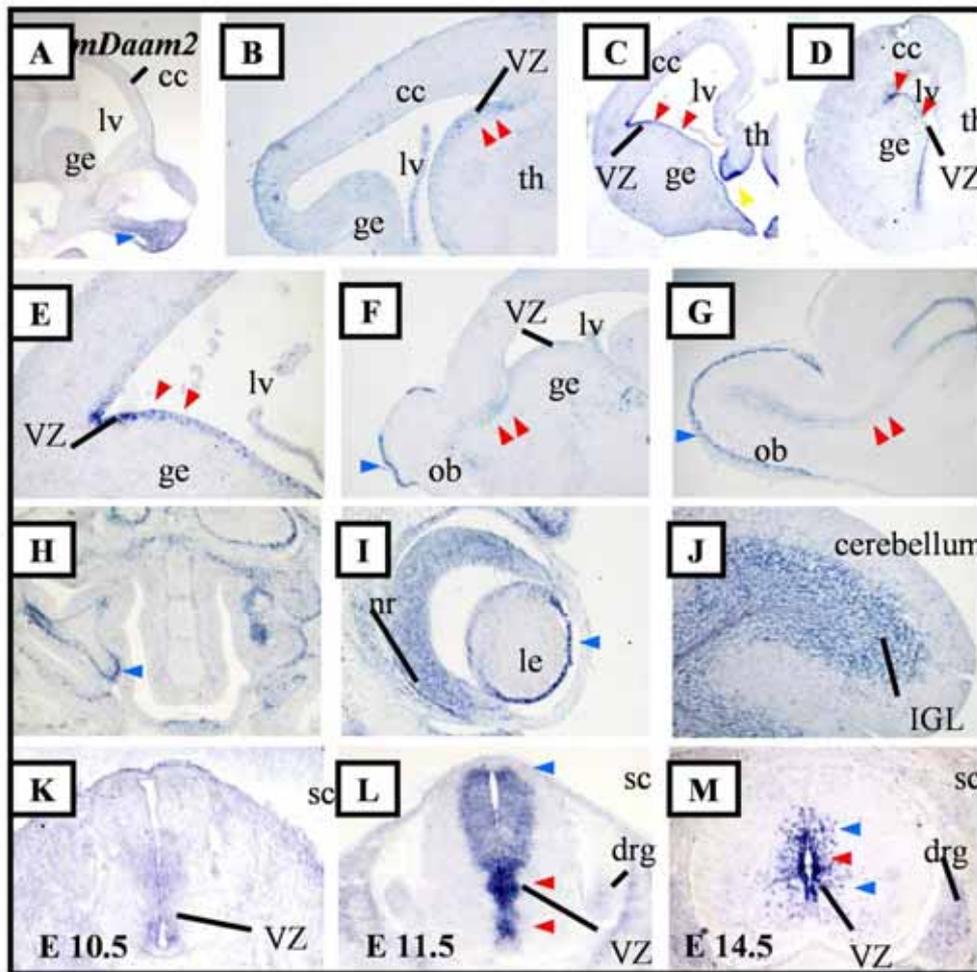


図 27 マウス *Daam2* の発現解析

(A)E10.5頭部、(B)E13.5日の脳切片、(F)E14.5日の脳切片 (C,E,G)E15.5日の脳切片、(D)E16.5日の脳切片、(H)E14.5日の嗅脳 (I)E14.5日の目 (J)成体小脳 (K-M)神経管の切片 色印は本文参照

lv; lateral ventricle, cc; cerebral cortex, ge; ganglionic eminence, th; thalamus, CP; cortical plate, VZ; Ventricular Zoon, ob; olfactory bulb, nr; neural retina, le; lens, IGL; inner ganglionic layer, drg; dorsal root ganglion sc; spinal cord

ニワトリ *Daam2*、*Daam2* 遺伝子の単離

我々は、ニワトリ *Daam* 遺伝子を、EST データベースにて探した。そこで、ヒットした 2 つの EST をシーケンスし、アミノ酸配列を比較した。EST #974E23 には、255 アミノ酸が含まれており、BLAST サーチによりヒト *Daam1* と高い相同性 (97%) が確認された (図 28A)。また、EST #766F23 には、302 アミノ酸が含まれて同様のサーチによりヒト *Daam2* と高い相同性 (83%) が確認された (図 28B)。

ヒト *Daam1* は、C 末側に 2 つの保存されたドメイン (FH1、FH2) がある。多くの FH ドメインを持つ FH 蛋白は細胞骨格制御にかかわり、Rho GTPase や細胞骨格要因と結合し、細胞の極性形成に関わっている (Tree et al., 2002)。 *Daam1* もアクチンの制御に関わっている (Habas et al., 2001)。また、*Daam1* と *Daam2* 間には、N 末側にもうひとつの保存ドメイン (図 28C 赤色部分) が存在し、EST #974E23 (ニワトリ

Daam1)にも保存されていた。このドメインは、FH 蛋白 mDia1/2/3 でも高く保存されているドメインであり、GTPase 結合ドメインであり、*Daam* においても重要なドメインであると予想される。これらのことから、*Daam* 遺伝子は他の FH 蛋白と同様に、Wnt、Rho GTPase、細胞骨格を制御し、細胞極性シグナルに関わるものであると考えられる。

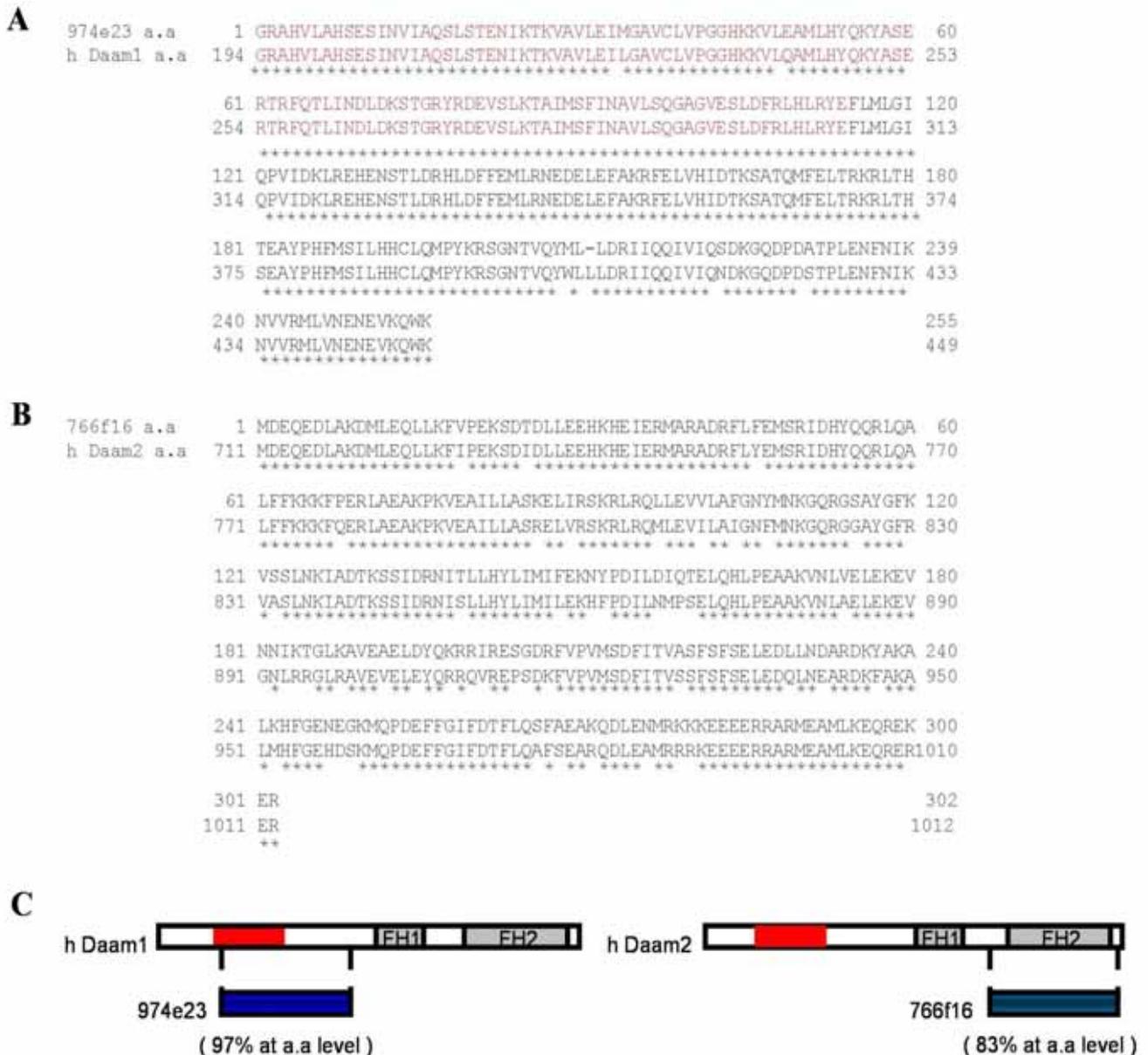


図 28 ニワトリ *Daam1*、*Daam2* 遺伝子のアミノ酸相同性

(A) EST 部分のニワトリ *Daam1* とヒト *Daam1* とのアミノ酸比較。97% との相同性を示した。

(B) 同ニワトリ *Daam2* の相同性。83% の相同性を示した。(C) *Daam1*、*Daam2* の蛋白構造 灰色は保存されている FH ドメインで、赤は N 末の新たな保存ドメイン

ニワトリ *Daam1*、*Daam2* 発現解析

まず、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ステージ 19 において、*Daam1* は肢芽遠位部に発現し、*Daam2* は肢芽領域の腹側に発現が見られた (Data not Shown)。しかし、神経組織での発現は確認できなかったため、またより詳

細に発現解析を行うため、切片を作成し染色を行った。

St11 に神経上皮のより腹側に発現し、背側は弱い発現がみられ、このようなパターンはSt18まで認められた(図29A-C)。St16にはその腹側発現がより強まっていたが、脊索や他の組織には発現は確認できなかった(図29B)。St18には、VZの発現が弱まり、より外側MZに、その発現の偏りが見られるようになってきた(図29C)。St23では、VZの発現はほとんど見られず、IZに強く、そのIZの発現はD/V軸に沿って3つのドメインとしてみられるようになってきた(図29D, 赤矢頭)。St28では、IZに一様に発現し、腹側IZ領域内に3つのブロック状に強く発現する部分が認められた(図29E 赤矢頭)。St35では、VZを除く神経管全体に広く発現が認められた(図29F)。一方、*Daam2*の神経管での発現はSt19に始まる。St19までは、神経管に隣接する体節で強く発現し(図30A) 神経管に発現が始まってからも、dermomyotomeで発現していた(図30B-E)。St23において底板に強く、VZ全体に弱く発現していた(図30D 赤矢頭)。その後、St28においても底板に強く(図30E 赤矢頭)、St35では底板と蓋板に発現し(図30F 赤矢頭) マウスと同様のドット状の発現を示した(図30F 青矢頭)。

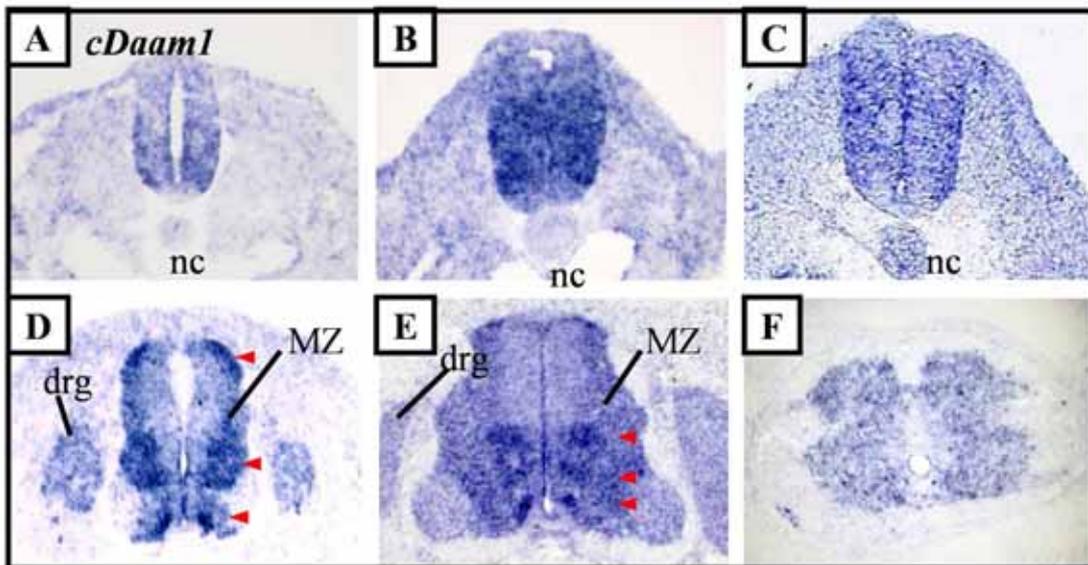


図 29 ニワトリ *Daam1* の神経管での発現解析

(A)St11、(B)St16、(C)St18、(D)St23、(E)St28、(F)St35 色印は本文参照
Nc; notochord, MZ; Mantle Zoon, drg; dorsal root ganglion

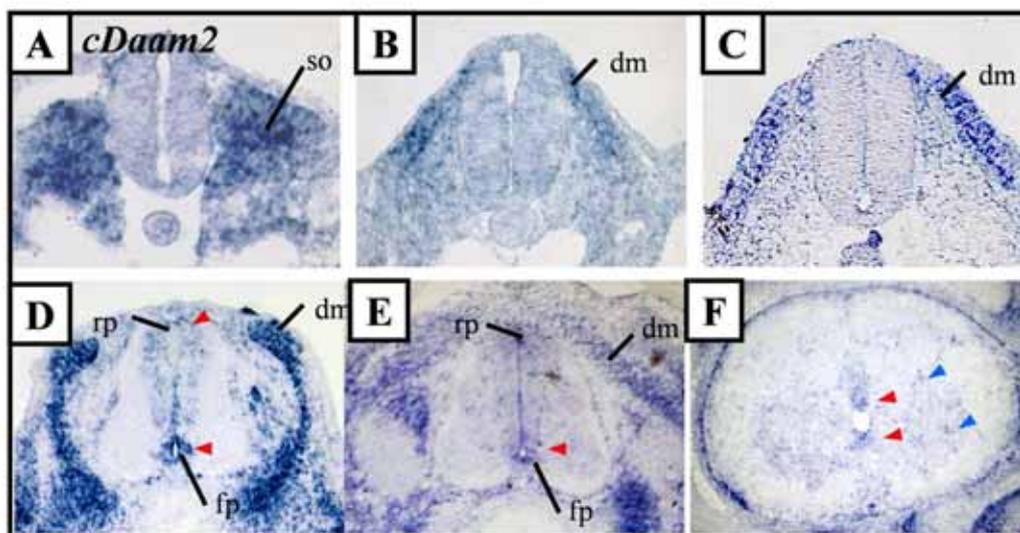


図 30 ニワトリ *Daam2* の神経管での発現解析

(A)St11、(B)St16、(C)St18、(D)St23、(E)St28、(F)St35 色印は本文参照
sc; somite, drg; dorsal root ganglion, rp; roof plate, fp; floor plate

RNAi による *Daam1* の機能阻害

マウスやニワトリの発現解析の結果、神経管において *Daam1*、*Daam2* が発現し、機能していることが予想された。特に、*Daam1* は神経管 IZ に発現が強く、背側 IZ に位置する交連神経の発達に関わる可能性がある。マウスやニワトリにおいて、LH2A/B 陽性の交連神経は、MBH1 によって誘導され、その軸索は底板をクロスし、対側 MZ の外側を經由し、脳に向かって登る (Imondi et al., 2001)。そこで、ニワトリ *Daam1* に対する RNAi を作成し、St14 の神経管にエレクトロポレーション法を用い、導入した。コントロール EGFP を導入し、48 時間後に、核を DAPI、MZ を tublin、で染色した (図 31A)。導入された細胞には交連神経も含まれており、その軸索が底板をクロスし、すべて対側へ向かっているのが確認できる (図 31A,C)。また、導入された細胞を緑、DAPI を青、MZ を赤で表示し、重ねると導入細胞は均一に分布していることが確認できる (図 31B)。一方、*Daam1* の RNAi を導入した場合、まず導入された細胞が均一にならず、塊を作っているのがわかる (図 31D)。重ねた図でみると、MZ にも細胞が認められるが、明らかにその数が減少していた (図 31E)。導入された緑の細胞群を見ると、MZ 領域にも多く認められるが、MZ マーカーとしての tublin が陰性であるものが多い。

このことから、導入細胞は MZ 領域に存在するが、MZ の個性は獲得していない可能性が考えられる。この切片を VZ マーカーの *Notch1* で染色すると、MZ に異所的な *Notch1* 陽性の細胞群が現れた (図 31G)。また、*Daam1* RNAi 導入の交連神経の軸索に変化が生じていた (図 31D,F)。まず、交連神経の軸索は、底板をクロスしたのに、軸束として対側 MZ に流れ上行する (図 31A,C) が、*Daam1* RNAi では軸索が広がり、束になっていない (図 31F)。さらに、軸索の一部は、クロスした後に底板に向かって、逆行するかのように曲がっていた (図 31F)。これらのことから、*Daam1* は IZ の背側では交

連神経の軸策の形態形成に關与し、腹側では、神経成熟に関わっていると考えられる。

RNAiによる *Daam2* の機能阻害

一方、*Daam2* RNAi を神経管に導入すると、導入細胞はVZには見られずほとんどがMZに局在し、MZにおいても強く *Tublin* 陽性であった(図31H,I)。交連神経の軸策においては、少し乱れは見られるが逆行することはなかった。これらは、VZに発現する *Daam2* の機能を阻害することでVZからMZに強制的に移動し、MZの機能を獲得したものと考えられる。

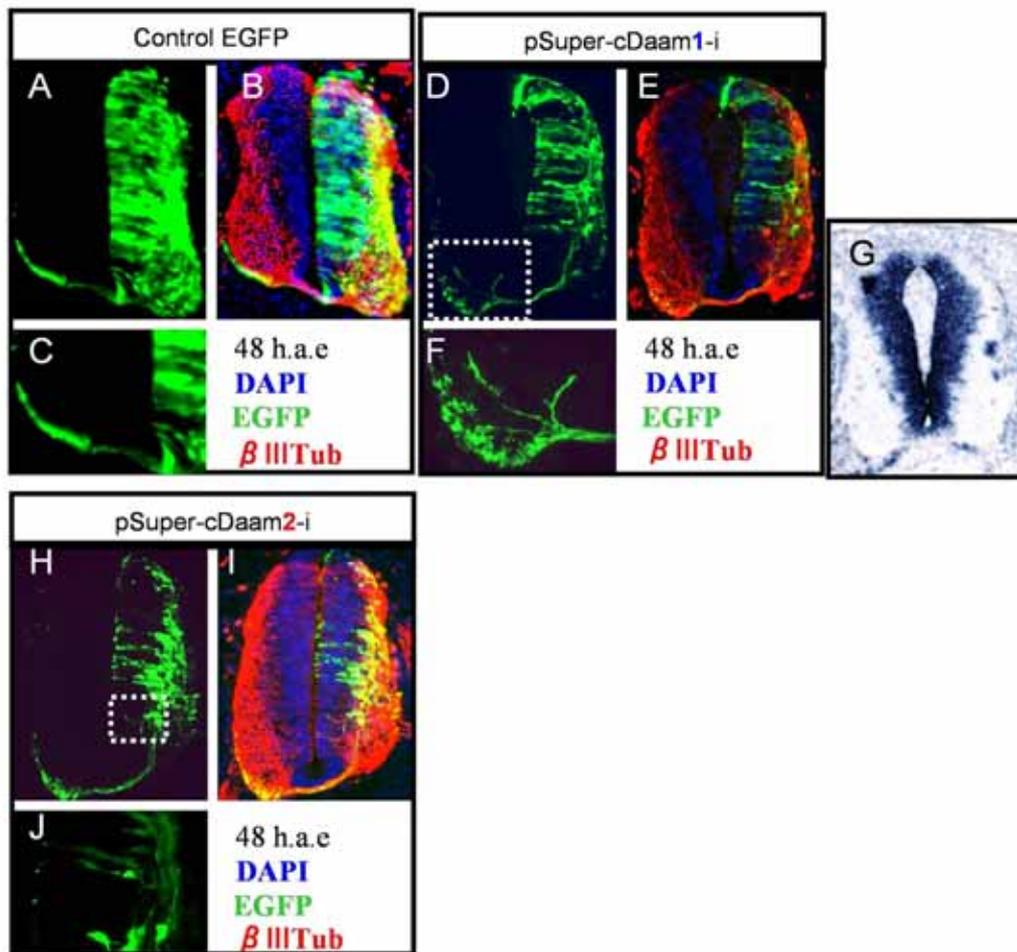


図 31 RNAiによるニワトリ *Daam1*、*Daam2* の機能阻害

St14 - 16神経管に、RNAi発現ベクターであるpSuperを導入した。導入細胞はEGFP(緑)でマーキングされ、神経管をDAPIで核染色し、*tublin*で染色した。(A-C)コントロールEGFP導入後48時間。右側に導入されたEGFP発現の交連神経軸策が対側に見える。BはMARGEで、Cは軸策拡大図。

(D-G) *Daam1* RNAi導入の場合の軸策と *Notch1* 染色 (G)。軸策が戻っているのがわかる (CとFの比較)。

(H-J) *Daam2* RNAi導入したところ、導入細胞がMZに早く移動した (BとIの比較)。Jは軸策がはっきりとみえ、発達しているのがわかる。

RNAiによる *Daam1*、*Daam2*機能阻害の確認

実際に、それぞれの RNAi が *Daam1*、*Daam2* の機能を阻害しているのかを培養細胞にてタグつき *Daam1,2* を回収し、ウェスタンブロッティング法を用いて検証した。Flag タグを誘導させたニワトリ *Daam1*、*Daam2* を単独、あるいは RNAi とともに 293 細胞へ導入し、その後 24 時間後に Lysete を用い、抗 Flag 抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行った。結果、Flag 融合型 *Daam1*、*Daam2* は、減少しており RNAi が効果を示していることが確認された (図 32)

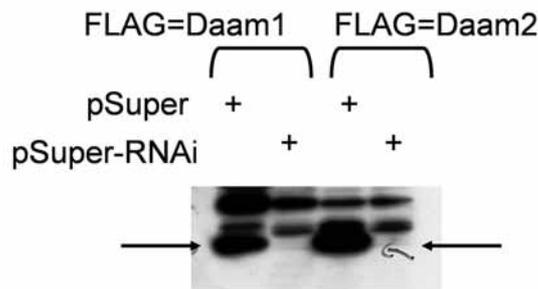


図 32 RNAiによるニワトリ *Daam1*、*Daam2*の機能阻害

293細胞にFLAGタグつきの *Daam1*、*Daam2*を導入し、24時間後に抗FLAG抗体を用いてWestern Blottingをおこなった。 *Daam1*、*Daam2*それぞれの p Super-RNAiを導入すると、コントロールpSuperと比較して、明確に発現が減少していた。

考察

中枢神経系における PCP 遺伝子の発現

マウス *Daam1*、*Daam2* が相補的に、中枢神経系につよく発現していることが明らかとなった。 *Daam1* は早くから SVZ に発現し、その発現は発生期において持続している。生後 20 日のマウス大脳においての *Daam1* は SVZ に発現している (Date not Shown)。生後の中枢神経において、神経幹細胞が存在しており、大脳においてのソースは SVZ に位置する細胞群である (Doetsch et al., 1999)。このことから、*Daam1* は早くから SVZ の個性を決めている可能性が強い。では、SVZ の個性とはどういったものか。SVZ の細胞群は、非常にあいまいなものである。発生期においては、神経前駆細胞によるエレベーター運動から離脱した細胞群が一時停滞する層であり、この層にある細胞群は、再びエレベーター運動に参加し分裂することもあり、一方ではそのまま MZ に移動し、分化成熟する場合もある (Noctor et al., 2004)。生後の神経幹細胞はエレベーター運動を行っておらず、一層の VZ 細胞の裏に隣接し、定着している。これらのことから、*Daam1* は SVZ 層として、停滞という機構に関与している可能性がある。 *Daam1* が制御する RhoGTPase を活性化すると、Actin の凝集がみられ、RhoGTPase の下流因子 ROCK の阻害剤では、細胞の遊走性が増す (Wong et al., 2001)。このことから、*Daam1* は中枢神経 SVZ において一時の停滞のための細胞骨格制御に関与している可能性がある。

ニワトリ神経管での *Daam1* の機能

マウス *Daam1* の発現は、胚性 10.5 日において、背側神経管に弱く発現し、胚性 11.5 日では LH2A 陽性介在神経が局在する背側神経管に強く発現していた。交連神経は、LH2A/B、MBH1 陽性の介在神経が、胚性 11.5 日に腹側に移動し、軸策を対側へ伸長させる (Saba et al., 2003)。ニワトリ胚においても交連神経の発生は同様であり (Leber and Sans, 1995)、またニワトリ *Daam1* も背側神経管に発現していた。これらのことは、交連神経の腹側への移動、成熟に *Daam1* が関与する可能性を示唆している。さらに、*Daam1* RNAi にて *Daam1* の機能を阻害すると、交連神経の軸策に変化が生じたこともこれを示唆している。

交連神経軸策は、Netrin/DCC シグナルによって底板まで伸長する (Salinas, 2003)。この後、底板を越えた後、Slit/Robo シグナルによる反発によって、軸策は底板より離れ、対側 MZ に向かう (Sabatier et al., 2004)。その後は、Wnt シグナルにより体軸吻側へ上行する (Lyuksyutova et al., 2004)。これらのことから、*Daam1* を介するシグナルは Slit/Robo シグナルに関わる可能性がある。実際、Slit 受容体の *Robo1* の神経管での発現は、*Daam1* と一致しており、機能的関与が十分に推測できる (Data not Shown)。さらに、PCP シグナル上流であると目されている *Wnt-5a* は神経管底板のみ発現している (Data not Shown)。したがって、今後、Wnt シグナルと Slit/Robo シグナルの相関性を、*Daam1* を用いて解析することが可能であると考えられる。

ニワトリ神経管での *Daam2* の機能

Daam2 の発現は *Notch1* 陽性の VZ に限局している。*Notch1* は神経前駆細胞に発現する遺伝子であるが、神経発生の後期においては Glia を誘導することが知られている (Lundkvist et al., 2001)。*Daam2* の発現開始は、マウス大脳では胚性 14.5 日以降であり、しかもより盛んに神経前駆細胞が分裂、増殖している大脳新皮質でなく、腹側 ganglionic eminence である。また、ニワトリ神経管でも神経前駆細胞の分裂が盛んである St20 前後の後に発現上昇してくる。これらのことから、その発現開始は比較的後期であり、Glia 誘導に関わる可能性がある。特に、マウス胚性 14.5 日やニワトリ St35 では、ドット状の発現パターンで、*Olig* 陽性のグリア系細胞のオリゴデンドロサイトの発現パターンに類似している (Liu et al., 2003)。オリゴデンドロサイトは、神経管内を盛んに移動している遊走性の高い細胞であることから、*Daam2* は移動に関与する可能性が考えられる。しかし、*Daam2* RNAi の結果は、VZ から MZ への移動を促進するものであった。この頃 *Olig* 陽性細胞は、特に MZ などで染色され、神経管全体に分布している (Liu et al., 2003)。しかし、*Daam2* 陽性の細胞群は、より VZ 側のみ強くみられることから、オリゴデンドロサイトの分化段階の早い細胞群に染色が強く、それらはまだ活発に移動していないのではないか。つまり、オリゴ

デンドロサイトの分化が終わるまで、その遊走性を抑えているのではないだろうか。したがって、ドット状の発現に加え、VZに強く発現しているのではないだろうか。したがって、*Daam2* RNAiにより機能を阻害すると、VZ細胞群はその遊走性を獲得してしまい、MZへ移動したと考えられる。このストーリーを検証するためには、今後オリゴデンドロサイトの発生時期にあわせた、*Daam2* RNAiの導入と解析を行う必要があるだろう。

総括

組織、器官の形成は、発生期における領域の決定を導く3次元の軸形成による。したがって、3つの軸をどのように誘導し、それをどのように個々の細胞群が解釈するのか、という疑問に挑戦することは、今後の発生学や再生学への参考知見となることは間違いない。

第1部では *Dach1* 遺伝子による機能解析を基に、ハエの遺伝学を参考にした領域決定のメカニズムを、分泌性誘導因子が細胞内でどのように修飾され、シグナルの多様性、統合を行っているかを解析した。分泌因子から転写制御までの統一したシグナルの理解を得たこれらの解析は、ハエにおける領域決定、ハエから保存された形態形成の基本概念を提唱するものとなった。そして、第3部では、肢芽形成のみならず、神経組織においても個々の細胞群の個性獲得は、軸形成とともに行われていることを明らかにした。

細胞の個性獲得の表現とし、細胞の挙動は極めて明確に現れる。そこで、最後に、PCP シグナルを脊椎動物神経発生の根本原理として考えうる可能性、そして考えなければならないという警鐘を鳴らす知見を得ることができた。この解析は、まだ不十分ではあるが、一歩進んだものであることは間違いないだろう。

材料と方法

1. 実験動物の調達

ニワトリ (Gallus, white Leghorn) 卵の有精卵はヤマギシから購入した。有精卵をトレーに横向きにして静置し、40℃ の孵卵機 (yamato) で湿潤環境を保ちながら生育させた。ニワトリのステージは Hamburger and Hamilton のステージ表 (Hamburger and Hamilton, 1951) に従い実験に用いるステージまで孵卵させた。マウスは日本クレアから購入した ICR マウスを掛け合わせ、ブランクチェックにより交配日を確認した。その後目的のステージまで雌マウスを育成し、マウス胚を得た。

2. *in situ* ハイブリダイゼーションに用いたプローブの作製

プローブ用の cDNA を組み込んだ pKRX ベクターを cDNA の 5' 側の制限酵素サイトで切断し、直鎖状にした。フェーノール/クロロホルムで DNA を精製し、これを鋳型としてプローブの合成に用いた。RNA polymerase による *in vitro* 転写は、組み込まれた cDNA の 3' 側のプロモーター (T3, T7) から行った。Transcriptional 溶液 (Roche) 2 μ l, DIG labeling mix (Roche) 2 μ l, RNase inhibitor (Roche) 1 μ l, T3 (もしくは T7) RNA polymerase (Roche) 1 μ l, 1 μ g/ μ l の直鎖状プラスミド DNA 1 μ l, DEPC-DDW 13 μ l を混合し、37℃ で 2 時間反応させた。その後 4M LiCl 2.5 μ l, 0.5 M EDTA 1 μ l, 100% エタノール 100 μ l を加え -30℃ で 2 時間静置した。4℃、15000rpm で遠心し、沈殿を 70% エタノールで洗浄した。風乾後、DEPC-DDW 40 μ l に溶解した。できたプローブを電気泳動で濃度を確認したのち -30℃ に保存した。

3. ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

基本的に Wilkinson の方法に従った (Wilkinson and Nieto, 1993)。各ステージまで成長させたニワトリ胚やマウス胚を PBS 中に取り出し、ビテリン膜や羊膜をピンセットで取り除いた。その後得られた胚を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS 中に入れ 4℃ で一晩固定した。翌日、固定液をデカンテーションで除き、25% メタノール/PBT, 50% メタノール/PBT, 75% メタノール/PBT (PBT: 最終濃度が 0.1% Tween20 になるように PBS で希釈したもの) でそれぞれ 5 分間置換した。その後 100% メタノールで 5 分間 x3 回洗浄し、胚を脱脂した。脱脂された胚は 100% メタノールの状態で -20℃ に保管した。100% メタノールに置換された胚を実体顕微鏡下で観察し、*in situ* ハイブリダイゼーションに用いる胚を選別した。選んだ胚は WHEATON 社の 4 ml バイアル瓶にいれた。バイアル瓶をシーソーに乗せ、室温で振倒しながら 75% メタノール/PBT, 50% メタノール/PBT, 25% メタノール/PBT, PBT で 5 分ずつ洗浄した。以下 PBS はジエチルピルカルボネート (DEPC) によって RNase を失活したものをを用いた。PBT によってさらに 2 回洗浄した後、4% H₂O₂ を含む PBT で 15 分間脱色、RNase

の失活を行った。PBT で 2 回洗浄した後、10 μ g/ml の Proteinase K を含む PBT に 10 分間置換し、透過処理を行った。その後 PBT で 2 回洗浄したのち、0.1% グルタルアルデヒドを含む 4% PFA 溶液で 20 分間再固定した。その後 PBT で 1 回洗浄したのち、ハイブリダイゼーション溶液（最終濃度；250 μ g/ml tRNA, 1 μ g/ml Heparin, 5x SSC, 1% SDS, 50% 生化学用ホルムアミドになるように DEPC 水で希釈したもの）に置換しハイブリオープンを用いて 68 °C で 1 時間ブロッキングした。その後 1 μ g/ml の DIG-RNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液に置換し、68 °C で 16 時間ハイブリダイズさせた。翌日、滅菌スポイトでプローブを除去した後、I 液（最終濃度；5x SSC, 1% SDS, 50% ホルムアミドになるように滅菌水で希釈したもの）で 30 分間 2 回洗浄した。次に II 液（最終濃度；2x SSC, 50% ホルムアミドになるように滅菌水で希釈したもの）で 30 分間 2 回洗浄した。その後 II 液:TBST (TBS に 1% Tween20 を希釈したもの)が 1:1 になるように希釈した溶液に置換し 10 分間洗浄した。そして TBST のみでさらに 10 分間洗浄したのち、ハイブリオープンからバイアル瓶を取り出し室温で 20 分間放置した。室温に戻ったのち、TBST で 1 回洗浄してから 10% Sheep serum を含む TBST に置換し 4 °C で 1 時間ブロッキングした。ニワトリの胚をアセトンで脱脂したパウダーをブロッキング液 10ml に 0.02g の割合で入れたものに、1/1500 量の抗 DIG 抗体を入れ、4 °C で 1 時間プレクリアーした。この溶液に胚を置換し、4 °C で 16 時間インキュベートした。翌日 TBST で 4 時間洗浄したのち、NTMT (5M NaCl 1ml, 1M Tris-HCl (pH 9.5) 5ml, 1M MgCl₂ 2.5ml, 20% Tween20 250 μ l に滅菌水を加えて 50ml にしたもの) に置換し 10 分間置換した。溶液を発色液 (NBT 45 μ l, BCIP 35 μ l を NTMT 10ml に希釈したもの)に置換し、暗所にて発色させた。発色後 PBT で洗浄した後、4% PFA 中に保存した。写真は胚を 0.1% PBS アガロース上に固定したものをオリンパスの双眼実体顕微鏡で撮影した。

4 . 切片 *in situ* ハイブリダイゼーション

メタノール固定して -20 °C 保存してある胚をトリミングし 10ml バイアル瓶に入れた。100% 脱水エタノールで 30 分間 x2 回洗浄した。その後キシレンで 30 分間 x2 回置換した。63 °C で融解させたパラフィンワックスに置換し 63 °C のインキュベーター内で 30 分間 x2 回置換した。アルミホイルで作成した容器に胚を移し、顕微鏡下でオリエンテーションを確認しながら固めた。翌日アルミホイルをはがしてマイクロトーム台に固定した。オリエンテーションを確認しながらマイクロトームの刃をあて 10 μ m の厚さで隣接切片を切った。切った切片は滅菌水を滴下したスライドグラス上にのせ 37 °C のパラフィン伸展器の上で乾燥させた。翌日切片をスライドグラスホルダー（以下はすべて 150ml の容器内にて洗浄、反応させた）に入れ、100% キシレンで 5 分間 x3 回洗浄しパラフィンを溶かした。続いて 100% エタノール, 90% エタノール, 70% エタノールでそれぞれ 5 分間置換した。PBT で 2 回洗浄した後、37 °C の 0.1 μ g/ml

Proteinase K/PBT 溶液に 7 分間浸し、細胞膜に穴を開けた。PBT で 3 回洗浄した後、4% PFA 溶液で再固定した。20 分後 PBT で 1 回洗浄した後、DIG ラベルしたプローブを 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにハイブリダイゼーション溶液 (ホルムアミド 750 μl , 20x SSC 375 μl , 10mg/ml tRNA 7.5 μl , 10% SDS 75 μl , 50 mg/ml Heparin 1.5 μl , DEPC-DDW 300 μl) に希釈し、変性させた。スライドガラスの上にプローブをのせ、パラフィルムでカバーした。保湿環境を保ちながら、68 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間ハイブリダイズさせた。翌日 68 $^{\circ}\text{C}$ 中で洗浄溶液 (DDW 200ml, 20x SSC 50ml, ホルムアミド 250ml) で 30 分 x2 回洗浄した。続いて洗浄溶液:TBST を 1:1 で希釈したもので 10 分間洗浄し、室温に出して 1 時間放置した。TBST で 2 回洗浄した後、ブロッキング溶液 (10% BBR (Roche)/5x マレイン酸溶液 30ml, heat-inactivated sheep serum 30ml, TBST 90ml) に浸し、1 時間ブロッキングした。その後 TBST で 2 回洗浄し、1/1000 量の抗 DIG 抗体をブロッキング液で希釈したもので 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間インキュベートした。翌日 2 mM レバミゾール (Sigma) 入り TBST で 5 分 x 3 回洗浄した後、NTMT に置換した。10 分後、発色液 (NBT 52.5 μl , BCIP 53 μl を NTMT 150ml に希釈したのもの) に入れ、1~2 日発色させた。発色後 PBT で軽く洗浄したのち、4% PFA で 20 分間固定した。切片の上に PVA (ポリビニルアルコール 1.2g, グリセロール 6g, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.5) 12ml, DDW 6ml) で封入した。翌日オリンパス顕微鏡でリバーサルフィルムに写真を撮った。

5 . アルシアンブルー染色 (骨染色)

骨染色をするためのアルシアンブルー染色は大内らの方法に従った (Ohuchi et al, 1997)。孵卵後 10 日目のニワトリ胚を 5% トリクロロ酢酸で 16 時間固定した。翌日 DDW で 2 回洗浄し、トリクロロ酢酸をのぞいた後アルシアンブルー染色溶液 (0.1% アルシアンブルー, 70% エタノール, 1% 塩酸) で 16 時間染色した。翌日アシドアルコール (70% エタノール, 1% 塩酸) で数回洗浄し、翌日まで洗浄した。70% エタノール, 90% エタノールで 1 日ずつ洗浄し、さらに 100% エタノールで 3 日間洗浄した。その後サリチル酸メチルに置換し 1 日置いた。そしてもう一度サリチル酸メチルを交換し、オリンパスの双眼実体顕微鏡下で軟骨組織を撮影した。

6 . ニワトリ胚へのエレクトロポレーション

ヤマギシ又は竹内孵卵場から購入した有精卵を横にして 48 時間インキュベートさせた。孵卵させた卵のアルブミンを 18G 針を使ってシリンジで 5ml 抜いた。卵の上部をはさみで楕円形にあけ、胚の下に墨汁 7G 針を使って 100 μl 注入した。墨汁を入れた穴にプラチナ製マイナス電極を差し込み予定肢芽領域の下にセットした。キャピラリーを用いてニワトリ胚を覆っているピテリン膜に穴をあけ St 14 の予定肢芽領域に 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈した DNA 溶液をキャピラリーを用いて口で吹いて注入した。滅菌 PBS

を胚の上にスポイトを用いて滴下した。もう一つのプラチナ製プラス電極を予定肢芽領域の上にセットし、9V, 50msec のパルス を 5 回かけた。エレクトロポレーション後、卵に開けた穴をビニールテープでふさいで孵卵器に戻した。

7 . BMP のビーズ移植

Heparin をコートしたアクリルビーズ樹脂 (SIGMA) を 1mg/ml BSA/PBS 中に取り出した。BMP を 35mm dish に 1 μ l 滴下し、その中にビーズを 1 つずつ入れ、室温で 1 時間吸着させた。1mg/ml BSA/PBS で 2 回洗浄したものを移植に用いた。St 19 のニワトリ胚肢芽にタングステン針で切れ込みを入れた。BMP のビーズをピペットマンで胚の上に滴下し、タングステン針を使って切れ込みにビーズを移植した。この時血管を傷付けないように注意した。

8 . 細胞培養および培養細胞への遺伝子導入

アフリカミドリザル腎臓由来 Cos7 細胞とマウス胎児筋前駆細胞由来 C2C12 細胞を、遺伝子導入、免疫沈降およびレポーターアッセイに用いた。細胞は 10% FCS、50unit/ml ペニシリン 50 μ g/ml ストレプトマイシン (SIGMA) を添加した Dulbecco s Modified Eagle s Medium (DMEM, SIGMA) を用いて 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ のインキュベーターで培養した。細胞の継代はトリプシン-EDTA (SIGMA) を用いて 3 日に一度行った。細胞の保存はセルバンカー (十慈フィールド) を用い、-80 $^{\circ}$ C に保存した。

9 . 培養細胞、組織切片での間接蛍光抗体法用

24 穴プレートに 1 枚のカバーガラス (13 丸 No.1 培養用、MATUNAMI) をいれ、培養した。Cos 7 細胞、C2C12 細胞を、 2×10^4 cells/well になるように遺伝子導入 12 時間前に蒔いた。FLAG タグ全長 *Dach1* あるいは、*Smad1*、*mSin3A*、DD2、HA タグ付き全長 *Dach1* あるいは DD1、をそれぞれ 0.5 μ g 用い、PRUS Reagent (invitrogen) 1 μ l と混ぜ、25 μ l の DMEM に溶解し DNA 溶液とした。その後、Lipofect (invitrogen) 1 μ l を 25 μ l の DMEM に混ぜものを DNA 溶液に混合し、細胞に添加し、250 μ l の培地を加えた。3 時間後、250 μ l の培地を加えて 24 時間培養した。培養後、3 回洗浄後、3% Formalin/PBS で 5 分間固定した。その後、3 回洗浄し、0.1% Triton-X 100/PBS で 5 分間室温浸透させた。洗浄後、5% BSA (ALBUMIN.BOVINE.A-9647, Sigma) /PBS で 30 分間ブロッキングし、1 次抗体を 100 μ l のせ室温、45 分間静置した。その後、5 回洗浄し、PBS にて 2500 倍希釈した 2 次抗体 (抗マウスあるいはラビット Alexa488 あるいは Alexa569) を 100 μ l のせ室温、45 分間静置した。最後に、5 回洗浄し、PVA で封入した。検鏡は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510 microscope) を用いて行った。組織は、*in situ* ハイブリダイゼーションと同様にパラフィンを除去し、PBS で洗ったあと、0.25% Triton X-100 を含む PBS 中にて 30 分間置いた。PBS で洗

ったあとは、細胞染色の場合と同様に行った。使用した1次抗体は、B Tublin (Tuj-1 抗体 1000 倍希釈、Promega)、EGFP (500 倍希釈、MBL)、P-Smad (200 倍希釈、Transduction Laboratories)。

10 . 免疫沈降法

上記の方法により、目的の遺伝子を導入した Cos7 細胞 (1×10^7 cells /100mm 培養皿) を PBS で洗浄し、回収液 (20mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 1mM EDTA) を 1ml 添加した。細胞を氷上で 30 分間静置した後、スクレイパーを用いてを回収し、15000rpm, 4℃、30 分間の遠心により可溶性画分を分取した。核画分は、細胞を 15000rpm 5 分で回収し、溶液 A (最終濃度 10mM Hepes (pH7.9), 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin) を 1ml 加え、15 分間氷上で静置した。0.58% となるように NP40 を加え、激しく混和し、氷上で 5 分間静置し、15000rpm, 4℃、5 分間の遠心にした。不可溶性画分に溶液 B (最終濃度 20mM Hepes (pH7.9), 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin) を 1ml 加え、激しく混和し、4℃にて 15 分間転倒混和した。15000rpm, 4℃、5 分間の遠心により可溶性画分を分取し核分画とした。抗体 1 μ g とアガロースビーズ (rProtainG Sepharose4 Fast Flow, Pharmacia) 15 μ l を 4℃で 1 時間混合して結合させ、そのアガロースビーズに 1ml の可溶性画分を加え、4℃で 12 時間振蕩した。15000rpm, 4℃、1 分間の遠心によりアガロースビーズを回収し、PBS で 5 回洗浄した。アガロースビーズに 15 μ l の 2X サンプル溶液を加え、95℃で 5 分間煮沸し、タンパク質を溶出させた。この溶出液を全量ウェスタンブロットティングに使用した。

11 . ウェスタンブロットティング

免疫沈降法を用いて回収したタンパク質溶出液をサンプルとして SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロースメンブレンにトランスファー溶液 (最終濃度 25mM Tris, 200mM Glycine, 0.1% SDS, 20% メタノール) を用いて転写した。メンブレンをブロッキング溶液 (3% スキムミルク, 25mM Tris-HCl (pH7.5), 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.1% Tween) 中で室温、1 時間振蕩した後ブロッキング 溶液で希釈した 1 次抗体溶液中で室温、1 時間浸透させた。メンブレンを TBST で 10 分間 3 回洗浄し、2 次抗体溶液中で室温、1 時間浸透させた後、TBST で 10 分間 5 回洗浄した。シグナルの検出には ECL kit (Amersham) を用いた。

12 . レポーターアッセイ、ルシフェラーゼ解析、 β -ガラクトシダーゼ解析

上記の方法にて細胞に遺伝子導入したのち、細胞抽出液 2 (25mM Tris-HCl (pH7.8), 15% グリセロール, 2% CHAPS, 1% Lecithin, 1% BSA, 4mM EGTA, 8mM MgCl₂, 1mM DTT,

0.4mM PMSF) を用いて細胞抽出液を分取し、ルシフェラーゼ解析と β -ガラクトシダーゼ解析に使用した。回収した細胞抽出液に反応液 A (0.1M KPO_4 , 2.5mM ATP, 10mM $MgCl_2$, 0.5mM Liciferin) を加え、Luminescencer-JNR (ATTO)により、検出した。細胞抽出液に反応液 B (60mM Na_2HPO_4 , 40mM MaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 0.33% β -メルカプトエタノール)を加え、37 $^{\circ}C$ 30分間反応させ、Labsystem Multiskan M.S (TERMO BIOANALYSIS) により、検出した。

参考文献

- Adler, P.N. (1992). The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays* 14, 735-741.
- Alberts, A.S (2001). Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J. Biol. Chem.* 276, 2824-2830.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Atkinson, S. J., and Stewart, M. (1991). Molecular basis of myosin assembly: coiled-coil interactions and the role of charge periodicities. *J Cell Sci Suppl* 14, 7-10.
- Berkes, C.A., Bergstrom, D.A., Penn, B.H., Seaver, K.J., Knoepfler, P.S. and Tapscott, S.J. (2004) Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol Cell* 14, 465-477.
- Calof, A.L., Mumm, J.S., Rim, P.C. and Shou, J. (1998). The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *J. Neurobiol* 36, 190-205.
- Campbell, G. (2002). Distalization of the *Drosophila* leg by graded EGF-receptor activity. *Nature* 418, 781-785.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 87-132.
- Capdevila, J., Tsukui, T., Rodriguez Esteban, C., Zappavigna, V. and Izpisua Belmonte, J. C. (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor *Meis2* and distal antagonism of BMPs by *Grem1*. *Mol. Cell* 4, 839-849.
- Caubit, X., Thangarajah, R., Theil, T., Wirth, J., Nothwang, H. G., Ruther, U., and Krauss, S. (1999). Mouse *Dac*, a novel nuclear factor with homology to *Drosophila Dachshund* shows a dynamic expression in the neural crest, the eye,

the neocortex, and the limb bud. *Dev Dyn* 214, 66-80.

Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G. (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-13285.

Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z., and Mardon, G. (1997). *Dachshund* and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91, 893-903.

Chen, Z.F., Paquette, A.J. and Anderson, D.J. (1998). *NRSF/REST* is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during \bar{H} genesis. *Nat Genet* 20, 136-142.

Clifford, R. J., and Schupbach, T. (1989). Coordinately and differentially mutable activities of *torpedo*, the *Drosophila melanogaster* homolog of the vertebrate EGF receptor gene. *Genetics* 123, 771-787.

Couso, J. P., and Bishop, S. A. (1998). Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 42, 345-352.

Cygan, J. A., Johnson, R. L. and McMahon, A. P. (1997). Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in *Wnt-7a* and *En-1* mutants. *Development* 124, 5021-5032.

Darken, R.S., Scola, A.M., Rakeman, A.S., Das, G., Mlodzik, M. and Wilson, P.A. (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J* 21, 976-985.

Davis, J. R., Shen, W., Sandler, I. Y., Amoui, M., Purcell, P., Maas, R., Ou, C., Vogel, H., Beaudet, L. A. and Mardon, G. (2001). *Dash1* mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb, and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1484-1490.

Dealy, C.N., Scranton, V. and Cheng, H.C. (1998). Roles of transforming growth

factor-alpha and epidermal growth factor in chick limb development.
Dev Biol 202, 43-55.

De Caestecker, M., and Meyrick, B. (2001). Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. Respir Res 2, 193-197.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, A. D., García-Verdugo, M.J. and Alvarez-Buylla Subventricular, A. (1999). Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. Cell 97, 703-716.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A. and McMahon, A.P. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell 75, 1417-1430.

Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C. and Bigas, A. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. J Biol Chem 278, 32227-32235.

Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., and Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP. Mech Dev 63, 39-50.

Fan, X., Brass, L. F., Poncz, M., Spitz, F., Maire, P., and Manning, D. R. (2000). The alpha subunits of Gz and Gi interact with the eyes absent transcription cofactor *Eya2*, preventing its interaction with the six class of homeodomain-containing proteins. J Biol Chem 275, 32129-32134.

F. Feigun, M. Hannus, M. Mlodzik and S. Eaton, The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. Dev. Cell 1 (2001) 93-101.

Ferguson, E. L., and Anderson, K. V. (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. Cell 71, 451-461.

Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless

protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 79, 273-282.

Gonzalez-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martinez, A. C., Mann, R. S. and Morata, G. (1998). Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* 394, 196-200.

Goto, S. and Hayashi, S. (1999). Proximal to distal cell communication in the *Drosophila* leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning. *Development* 126, 3407-3413.

Grimes, J.A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry, D.L., Atouf, F., Holdener, B.C., Mandel, G., and Kouzarides, T. (2000). The co-repressor *mSin3A* is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J Biol Chem* 275, 9461-9467

Gubb, D. (1993). Genes controlling cellular polarity in *Drosophila*. *Development Suppl*, 269-277.

Gunhaga, L., Marklund, M., Sjöström, M., Hsieh, J., Jessell, T.M. and Edlund, T. (2003). Specification of dorsal telencephalic character by sequential Wnt and FGF signaling. *Nat. Neuro* 6, 701-707.

Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein *Daam1*. *Cell* 107, 843-854.

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

Hammond, K. L., Hanson, I. M., Brown, A. G., Lettice, L. A., and Hill, R. E. (1998). Mammalian and *Drosophila* *Dachshund* genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech Dev* 74, 121-131.

Hammond, K. L., Lettice, L. A., Hill, R. E., Lee, M., Boyle, S., and Hanson, I. M. (1999). Human (*DACH*) and mouse (*Dach*) homologues of *Drosophila* *Dachshund*

map to chromosomes 13q22 and 14E3, respectively. *Genomics* 55, 252-253.

Hayashi, H., Mochii, M., Kodama, R., Hamada, Y., Mizuno, N., Eguchi, G. and Tachi, C. (1996). Isolation of a novel chick homolog of Serrate and its coexpression with *C-Notch1* in chick development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 1089-1096.

Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., and Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2*, and *Six1*, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 13, 3231-3243.

Heanue, T. A., Davis, R. J., David H. R., Kispert, A., McMahon, A. P., Mardon, G. and Tabin, C. J. (2002). *Dach1*, a vertebrate homologue of *Drosophila Dachshund*, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of Pax and *Eya* genes. *Mech. Dev.* 111, 75-87.

Heberlein, U., Wolff, T., and Rubin, G. M. (1993). The TGF beta homolog *Dpp* and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* 75, 913-926.

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F. and Kemler, R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 9, 1839-1850.

Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J., and Pourquie, O. (1997). *Noggin* acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development* 124, 4605-4614.

Horner, A., Shum, L., Ayres, J. A., Nonaka, K. and Nuckolls, G. H. (2002). Fibroblast growth factor signaling regulates *Dach1* expression during skeletal development. *Dev. Dyn.* 225, 35-45.

Huelsken, J. and Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway.

J Cell Sci. 115, 3977-3978.

Imondi, R. and Kaprielian, Z. (2001). Commissural axon pathfinding on the contralateral side of the floor plate: a role for B-class ephrins in specifying the dorsoventral position of longitudinally projecting commissural axons. *Development* 128, 4859-4871.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.

Johansson, B.C., Momma, S., Clarke, L.D., Risling, M., Lendahl, U. and Frisén, J. (1999). Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell* 96, 25-34.

Johnson, R. L. and Tabin, C. J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90, 979-990.

Kao, H. Y., Downes, M., Ordentlich, P., and Evans, R. M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev* 14, 55-66.

Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D, Itoh T, Rodriguez Esteban C, Izpisua Belmonte JC. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104, 891-900.

Kim, S., Zang, R., Braunstein, E. S., Joachimial, A., Gvekl, A. and Hogde, A. (2002). Structure of the retinal determination protein *Dachshund* reveals a DNA binding motif. *Structure* 10, 787-795.

Kozawa, O., Hatakeyama, D. and Uematsu, T. (2002). Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 84, 583-589.

Kumar, J. P., and Moses, K. (2001). The EGF receptor and notch signaling pathways control the initiation of the morphogenetic furrow during *Drosophila* eye

development. *Development* 128, 2689-2697.

Kurtzman, A. L., and Schechter, N. (2001). Ubc9 interacts with a nuclear localization signal and mediates nuclear localization of the paired-like homeobox protein Vsx-1 independent of SUMO-1 modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5602-5607.

Leber, M.S. and Sanes, R.J. (1995). Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J. Neurosci.* 15, 1236-1248.

Lee, K. J., Dietrich, P., and Jessell, T. M. (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403, 734-740.

Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G. (2002). Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* 297, 1180-1183.

Liu, R., Cai, J., Hu, X., Tan, M., Qi, Y., German, M., Rubenstein, J., Sander, M. and Qiu, M. (2003). Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor. *Development* 130, 6221-6231.

Liu, .Y, Helms, A.W. and Johnson, J.E. (2004). Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development. *Development* 131, 1017-1028.

Lundkvist, J. and Lendahl, U. (2001). Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci.* 24, 492-494.

Lyuksyutova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, J., Nathans, Y., Tessier-Lavigne, M. and Zou, Y. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302, 1984-1988.

Ma, D., Yang, C.H., McNeill, H., Simon, M.A. and Axelrod, J.D. (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* 421, 543-547.

Machon, O., Backman, M., Julin, K., and Krauss, S. (2000). Yeast two-hybrid system identifies the ubiquitin-conjugating enzyme mUbc9 as a potential partner of mouse *Dac*. *Mech Dev* 97, 3-12.

Machon, O., van den Bout, C.J., Backman, M., Rosok, O., Caubit, X., Fromm, S.H., Geronimo, B. and Krauss S. (2002). Forebrain-specific promoter/enhancer D6 derived from the mouse *Dach1* gene controls expression in neural stem cells. *Neuroscience*. 112, 951-966.

Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124, 1109-1117.

Mardon, G., Solomon, N. M., and Rubin, G. M. (1994). *Dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120, 3473-86.

Marín, O. and J.L. Rubenstein, J.L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441-483.

Martin, G. R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 12, 1571-1586.

Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.

Megason, S.G. and McMahon, A.P. (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087-2098.

McCabe, B.D., Hom, S., Aberle, H., Fetter, R.D., Marques, G., Haerry, T.E., Wan, H., O'Connor, M.B., Goodman, C.S. and Haghghi, A.P. (2004). Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron*. 41, 891-905.

Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M. (1999). The BMP antagonist *Gremlin* regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*

126, 5515-5522.

Mishima, N. and Tomarev, S. (1998). Chicken Eyes absent 2 gene: isolation and expression pattern during development. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1109-1115.

Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* 16, 548-53.

Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-482.

Nishihara, S., Tsuda, L. and Ogura, T. (2003). The canonical Wnt pathway directly regulates *NR5F/REST* expression in chick spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 55-63.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7, 136-144.

Nusse, R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* 1999 15, 1-3

Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawauchi, M., Shiota, K., Mak, T.W. and Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development.* 121, 3291-3301.

Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., and Noji, S. (1997) The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with *Fgf-8*, an apical ectodermal factor. *Development* 124, 2235-2244.

Palm, K., Metsis, M. and Timmusk, T. (1999). Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/*NRSF*/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 72, 30-39.

Panchision, D.M., Pickel, J.M. Studer, L., Lee, S., Turner, P.A., Hazel, T.G. and McKay, R.D. (2001). Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate *Genes Dev.* 2001 15: 2094-2110.

Pennartz, S., Belvindrah, R., Tomiuk, S., Zimmer, C., Hofmann, K., Conradt, M., Bosio, A., Cremer, H. (2004). Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. *Mol Cell Neurosci.* 25, 692-706.

Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.

Pizette, S., Abate-Shen, C. and Niswander, L. (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128, 4463-4474.

Pizette, S. and Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126, 883-894.

Rawls, A.S. and Wolff, T. (2003). Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 130, 1877-1887.

Rubin, L. and Saunders, J. W. Jr. (1972). Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick 胚: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev. Biol.* 28, 94-112.

Saba, R., Nakatsuji, N. and Saito, T. (2003). Mammalian BarH1 Confers Commissural Neuron Identity on Dorsal Cells in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 23, 1987-1991.

Sabatier, C., Plump A.S., Le, Ma., Brose, K., TamaDaamurakami, F., Lee, E.Y., Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117, 157-169.

Salinas, P.C. (2003). The morphogen sonic hedgehog collaborates with netrin-1 to guide axons in the spinal cord. *Trends Neurosci.* 26, 641-643.

Sampson, D. A., Wang, M., and Matunis, M. J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 21664-21669.

Saunders, J. W., and Gasseling, M. T. (1968) Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In: R. Fleischmajer and R. E. Billingham, Editors, *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Williams & Wilkins, Baltimore, 78-97.

Schwabe, J. W., Rodriguez-Esteban, C. and Izpisua Belmonte, J. C. (1998). Limbs are moving: where are they going? *Trends Genet.* 14, 229-235.

Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L.G., Lawrence, H.J. and Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and *MEIS1* in myeloid cells. *Mol Cell Biol.* 19, 3051-3061.

Shulman, J.M., Perrimon, N. and Axelrod, J.D. (1998). Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Genet.* 14. 452-458.

Slusarski, D.C., Corces, V.G. and Moon, R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413.

Strutt, D.I., Weber, U. and Mlodzik, M. (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signaling. *Nature* 387, 292-295.

Sun X, Mariani FV, Martin GR. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418, 501-508.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. and Greenberg, M.E.(2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms.

Cell 104, 365-376.

Swiatek, P.J., Lindsell, C.E., del Amo, F.F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). *Notch1* is essential for postimplantation development in mice.

Genes Dev. 15, 707-719.

Tabata, H. and Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. 23, 9996-10001

Tabuchi, A., Yamada, T., Sasagawa, S., Naruse, Y., Mori, N. and Tsuda M. (2002). REST4-mediated modulation of REST/*NRSF*-silencing function during BDNF gene promoter activation. Biochem Biophys Res Commun. 290, 415-420.

Takeda, M., Mizuide, M., Oka, M., Watabe, T., Inoue, H., Suzuki, H., Fujita, T., Imamura, T., Miyazono, K. and Miyazawa K. (2003). Interaction with *Smad4* is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski. Mol Biol Cell. 15, 963-972.

Timmer, J.R., Wang, C. and Niswander, L. (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. Development 129, 2459-2472.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D. and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. Dev. Cell 5 367-377.

Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H., Moon, R.T. (2003). Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. Curr Biol. 13, 680-685.

Wang, W., Mariani, F. V., Harland, R. M., and Luo, K. (2000). Ski represses bone

morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14394-14399.

Wilkinson, D. G. and Nieto, M. A. (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 225, 361-373.

Wolff, T. and Rubin, G.M. (1998). *Strabismus*, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development* 125, 1149-1159.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., Wu, J.Y., Xiong, W.C. and Rao, Y. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.

Wu, J. and Cohen, S.M. (1999). Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by *Homothorax* and *Distal-less*. *Development* 126, 109-117.

Wotton, D. and Massague, J. (2001). *Smad* transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 254, 145-64.

Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell.* 64, 635-647.

Yang, C.H., Axelrod, J.D. and Simon, M.A. (2002). Regulation of *Frizzled* by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye. *Cell* 108, 675-88.

Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N., Kuroiwa, A. (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 122, 3725-34.

Zhang, X., Friedman, A., Heaney, S., Purcell, P., Maas, R.L. (2002). *Meis* homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis.

Genes Dev. 16, 2097-107.

謝辞

本研究を行うにあたり、非常に多くの方々に御指導を賜りました。それぞれの方々がいろいろな視点からディスカッションして頂いたおかげで研究室を超え、国境を超え、発生学について学ぶことができました。この場をかりて心よりお礼を申し上げます。

小椋利彦教授（現、東北大学加齢医学研究所）と高橋直樹教授には、自由で良い研究環境と終始適切な御指導を賜りました。心から感謝致します。また動物代謝調節学講座の先輩をはじめ、教室の皆様にはいろいろなアドバイスや励ましを頂きました。自分とは異なる領域の研究分野でも何事も興味を持ってディスカッションして下さい、とても有意義で刺激になりました。心から感謝します。発生学の楽しさ、形づくりのおもしろさなど考え方についても多くのことを学びました。心より感謝申し上げます。

分子発生生物学講座の安田國雄教授と研究室の皆様には、学会等など通じてディスカッションして頂き、貴重なアドバイスを頂きました。

論文をまとめる時には様々な方にご助言を頂きました。プローブやcDNAの提供において、A.E.Munsterberg, C.Tabin, 黒岩厚先生、野次澄晴先生、上野直人先生、Juan Carlos 博士、故梅園和彦博士、安田國雄教授に感謝致します。

このような様々な先生方、先輩方のおかげで、生物学の奥深さ、発生学のおもしろさ、再生への希望を感じ、論文を出し、また携わる研究ができました。この場をかりてお礼申し上げます。