

脊椎動物の体節形成過程において  
分節境界を誘導するシグナル

渡邊 忠由

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(高橋 淑子 教授)

平成18年12月25日提出

## =目次=

要旨	-----	p. 3
(1) 序論	-----	p. 5
結果	-----	p. 7
(2) 予定体節中胚葉細胞における cMeso-1、Pax2 及び RhoA の活性は		
	原腸陥入を阻害した---	p. 7
(3) 体節中胚葉における分節境界誘導の分子機構を解明するため、		
	ニワトリ胚において遺伝子発現誘導システム (Tet-on) を確立した---	p. 8
(4) ニワトリ胚において遺伝子発現停止システム (Tet-off) を確立した---		p. 9
(5) cMeso-1 や Pax2 は体節中胚葉において細胞凝集を引き起こした-----		p. 9
(6) cMeso-1 は Pax2 を介して NCAM を誘導し、細胞凝集を引き起こした--		p. 10
(7) RhoA の活性は体節中胚葉において細胞死を引き起こした-----		p. 12
(8) cMeso-1 発現細胞はセグメンター活性を示した-----		p. 12
(9) cMeso-1 は体節中胚葉において <i>EphA4</i> , <i>PAPC</i> 及び <i>Sox9</i>		
	の発現を誘導した-----	p. 13
(10) <i>EphA4</i> 発現細胞はセグメンター活性を示した-----		p. 13
(11) <i>EphA4</i> は体節中胚葉において Notch signaling を活性化しなかった--		p. 14
(12) Notch signaling は体節中胚葉において		
	<i>EphA4</i> の発現に必要十分である-----	p. 15
(13) cMeso-1 が分節境界を誘導するのに、 <i>EphA4</i> 以外		
	の細胞間シグナル伝達因子が存在する可能性がある-----	p. 15
(14) ephrin reverse signaling は分節境界誘導に必要十分である-----		p. 16
(15) 考察	-----	p. 17
<図> (1) ~ (15)	-----	p. 26
材料と方法	-----	p. 41
謝辞	-----	p. 47
参考文献	-----	p. 48

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座 (高橋 淑子 教授)		
氏名	渡邊 忠由	提出	平成18年12月25日
題目	脊椎動物の体節形成過程において分節境界を誘導するシグナル		

要旨

脊椎動物のしなやかな動きに不可欠であり、脊椎動物の体において共通した特徴である前後軸に沿った繰り返し構造（脊椎骨、骨格筋、神経節、血管など）は、初期発生過程における体節中胚葉の分節パターンを基盤として形成される。このパターンは、発生の初期過程において未分節中胚葉と呼ばれる前後軸に沿ったひとつづきの組織が前側から順々に分断されていくことにより形成される（分節化）。このように非常に重要な発生現象である未分節中胚葉の分節化に関して、現在までに以下の2つの知見が得られている。<1> 主に組織移植と遺伝子導入が容易なニワトリ胚を用いた研究から、次に分節化する部位（レベル-1）のすぐ後方に位置する細胞が分節境界の誘導活性（セグメンター活性）を有することが解っている（Sato et al., 2002）。<2> ノックアウトマウスの解析から、レベル-1 後方特異的に発現する転写因子 Mesp2 が分節化に必須であることも示されている（Saga et al., 1997）。

しかしながら、分節境界形成時における Mesp2 の下流において起こる細胞挙動を説明し得る分子機構は未だに不明なままである。

そこで、この分子機構を解明する手がかりを得るため、Mesp2 のニワトリホモログ cMeso-1 に着目した。cMeso-1 の分節境界形成における役割を解析する手法として、ニワトリ胚では *in ovo* electroporation によって体節中胚葉特異的に遺伝子を導入することが可能である。このとき、技術的な問題から、原腸陥入（表層に位置する上皮様の予定体節中胚葉細胞等が間充織化して胚体内に潜り込んでいく現象）の前段階に遺伝子導入を行う必要がある。また、この際に従来は恒常活性型プロモーター（CAGGS）によって遺伝子発現が制御されるベクターを用いていた。この手法により、cMeso-1 を予定体中胚葉領域で発現させると、体節中胚葉になる前段階の原腸陥入が阻害された。

この問題を解決するために、ニワトリ胚において時期特異的に遺伝子発現を誘導できる系 (Tet-on system) を確立し、体節中胚葉になったのちに、cMeso-1 を発現させた。その結果、cMeso-1 発現細胞同士の凝集が起き、このとき転写因子 Pax2 を介して接着因子 NCAM の発現が誘導されていることが解った。これらのことから、cMeso-1→Pax2→NCAM という分子カスケードが働いて、未分節中胚葉レベル-1 後方の細胞同士の凝集を引き起こしている可能性が示された。

次に、この細胞凝集がセグメンター活性の原動力になっているのかを調べるために、Tet-on system と組織移植を組み合わせることによって、体節中胚葉において異所的に cMeso-1 や Pax2 それぞれの発現境界をつくった (セグメンター・アッセイ)。この実験系を用いて、cMeso-1 や Pax2 の発現境界と分節化誘導の関係を調べた結果、cMeso-1 の発現境界に沿って異所的に分節化が起きたが、Pax2 の場合には、このような影響は見られなかった。これらのことから、cMeso-1 は Pax2 を介さずに分節境界を誘導している可能性が示された。

このため、cMeso-1 下流に位置するほかの因子のスクリーニングとセグメンター・アッセイを行った。その結果、EphA4 (主に細胞培養系において細胞間反発因子として知られる膜タンパク質) の場合にだけ、異所的な発現境界に沿って、新たな分節境界の形成が見られた。EphA4 は相手方の ephrinB2 と結合することにより、一定条件下においてそれぞれの発現細胞内へシグナルが伝わる (EphA4 forward signaling, ephrinB2 reverse signaling)。これらの因子の細胞内ドメインを欠損したコンストラクトをそれぞれ使って、分節境界の誘導能を調べたところ、ephrinB2 reverse signaling が、分節境界誘導に必要十分であることが示された。これらの研究から、ephrinB2 reverse signaling 活性こそがセグメンター活性の分子実体であると結論づけられた。



## (1) 序論

多細胞生物体内の様々な器官や組織が作られる過程において、もとは同一の細胞集団であったものを、別々の細胞集団に区分する作業は、欠かせないものである。そして、この作業に先立ち、予定境界に沿った特異的な遺伝子の発現がしばしば見られる（脊椎動物胚の後脳やキイロショウジョウバエ胚の wing imaginal disc など）(Blair, 2003; Blair, 2004; Dahmann and Basler, 1999; Irvine and Rauskolb, 2001; Irvine and Vogt, 1997; Larsen et al., 2001; Manjon et al., 2007; McNeill, 2000; Nakamura et al., 2005; Rhinn et al., 2006; Sanson, 2001; Takahashi, 2005; Tepass et al., 2002; Vargesson et al., 1998)。しかしながら、それらの遺伝子が、どのようにして細胞集団の区別を制御するのかについては、いまだに不明な部分が残っている。このような境界形成のメカニズムを研究する上で、脊椎動物の初期発生過程において形成される体節中胚葉（図 1）は、良いモデル系の一つである（Aulehla and Herrmann, 2004; Saga and Takeda, 2001; Takahashi, 2005）。

体節中胚葉の繰り返しパターンは、脊椎動物の体において特徴的な前後軸に沿った繰り返し構造（脊椎骨、骨格筋、神経節、血管など）(Aoyama et al., 2005; Graef et al., 2001; Krull, 2001) を形成する基盤になっている。このパターンは、未分節中胚葉（図 1A）と呼ばれる前後軸に沿ったひとつづきの組織が前側から順々に分節化されていくことにより形成される（ニワトリ胚の場合、約 90 分周期，図 1A）。この際、細胞レベルでは次に分節化する部位（レベル-1，図 1）に均一に配置していた間充織細胞群の間にギャップが形成され、つづいて前方の細胞が上皮化することが観察されている（図 1B）(Sato et al., 2002)。このように非常にダイナミックな細胞挙動が起こる未分節中胚葉の分節化のメカニズムに関して、これまでに以下 2 つの知見が得られている。第一に、主に組織移植と遺伝子導入が容易なニワトリ胚を用いた研究から、次に分節化する部位（レベル-1，図 1A）のすぐ後方に位置する細胞が分節境界の誘導活性（セグメンター活性，図 1A）を有することが解っている（Sato et al., 2002）。第二に、レベル-1 後方特異的に発現する転写因子をコードする *Mesp2* のノックアウトマウスでは体節中胚葉において分節構造ができないことから、*Mesp2* が分節化に必須であることも示されている（Saga et al., 1997）。しかしながら、分節境界形成時に *Mesp2* の下流において起こる細胞挙動を説明し得る分子機構は未だに不明なままである。

そこで、この分子機構を解明するための糸口として、*Mesp2* のニワトリホモログである転写因子 *cMeso-1* (Buchberger et al., 1998) に着目した。

cMeso-1 の未分節中胚葉の分節化における役割を研究するために、ニワトリ胚を用いた。ニワトリ胚は、主に2つの理由から利用価値の高いモデル生物である。一つ目の理由は、ニワトリ-ウズラ間の局所的な組織移植により、脊椎動物において詳細な組織間相互作用や細胞系譜の解析ができる点である (LeDouarin and Kalcheim, 1999)。二つ目の理由は、*in ovo* electroporation によって、組織特異的に遺伝子導入が行える点である (Momose et al., 1999; Muramatsu et al., 1998; Yasuda et al., 2000)。この *in ovo* electroporation を用いて、体節中胚葉特異的に遺伝子を導入する手法もすでに確立されており、体節中胚葉での遺伝子の役割を解析することが可能である (Nakaya et al., 2004; Sato et al., 2002)。このとき、技術的な問題から、原腸陥入 (表層に位置する上皮様の予定体節中胚葉細胞等が上皮-間充織転換を起こして胚体内に潜り込んでいく現象, 図 2C) の前の予定体節中胚葉細胞 (Catala et al., 1996; Psychoyos and Stern, 1996; Sawada and Aoyama, 1999) に遺伝子導入を行う必要がある (図 2C)。また、従来の *in ovo* electroporation においてほとんどの場合、恒常活性型プロモーター (CAGGS) (Niwa et al., 1991) が使われてきた。*in ovo* electroporation による遺伝子導入後、このプロモーターは、2.5 時間内に活性化する (Momose et al., 1999; Yasuda et al., 2000)。しかしながら、解析の対象となる遺伝子が、発生過程の初期・後期それぞれで繰り返し別々に働いている場合、遺伝子を導入して発生初期に大きな影響が出ると、後期での遺伝子の役割の解析が困難になる。実際に、cMeso-1 も原腸陥入中の予定体節中胚葉細胞とレベル-1 後方の未分節中胚葉細胞の両方で発現しており (Buchberger et al., 1998)、cMeso-1 を予定体節中胚葉領域に導入すると、cMeso-1 導入した細胞の原腸陥入が阻害された (図 2 F, K)。

そこで、遺伝子発現の誘導時期を自由に制御できるシステム (Tet-on, 図3A) (Furth et al., 1994; Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995; Hinrichs et al., 1994; Orth et al., 1998) をニワトリ胚で用いることを試みた。その結果、tetracycline 依存的に遺伝子発現を制御することに成功した (図3 B, E)。この技術を用いて、体節中胚葉において、cMeso-1 が Pax2 を介して NCAM の発現を誘導して、細胞凝集を引き起こすことが解った。

またニワトリ胚においては、*in ovo* electroporation と組織移植とを組み合わせることにより、局所的に遺伝子の役割の解析ができる (Sato et al., 2002; Stern, 2005; Tonegawa et al., 1997)。この利点と Tet-on system を組み合わせることによって、体節中胚葉において異所的に cMeso-1 や下流因子の発現境界をつくり (セグメンター・アッセイ)、そこでの細胞の挙動を解析した。この解析を中心として、分節境界誘導シグナルを統合・制御する転写因子

(cMeso-1)、及び最終的な分節境界誘導の実体であると考えられる細胞間反発因子 (Eph/ephrin) という分節境界形成における分子メカニズムの全体像を見出した。

## 結果

### (2) 予定体節中胚葉細胞におけるcMeso-1、Pax2及びRhoAの活性は原腸陥入を阻害した

未分節中胚葉の分節化における分子メカニズムを解明するために、まずレベル-1に沿って発現する転写因子cMeso-1 (図2A) (Buchberger et al., 1998) に着目した。cMeso-1の体節中胚葉での役割を解明するために、*in ovo* electroporationにより、cMeso-1の体節中胚葉で強制発現させることを試みた。従来、体節中胚葉に遺伝子を導入する際は、原腸陥入前の表層に位置する上皮様の予定体節中胚葉細胞に導入している (図2C) (Sato et al., 2002)。なぜなら、原腸陥入後の体節中胚葉は、外胚葉と内胚葉に囲まれており、*in ovo* electroporationによる遺伝子導入が困難なためである。この手法を用いて従来の恒常活性型プロモーターCAGGSにつないだcMeso-1 cDNA (pCAGGS-cMeso-1, 図2D) をpCAGGS-EGFPと共に、*in ovo* electroporationによってニワトリ1日目胚 (Stage 8) (Hamburger and Hamilton, 1992) の原腸陥入前の予定体節中胚葉領域に導入して、24時間後に遺伝子導入胚を観察した (図2C)。その結果、cMeso-1を強制させた予定体節中胚葉細胞の原腸陥入が阻害されていた ( $n=34$ 個体; 図2 F, K)。ControlのpCAGGSとpCAGGS-EGFPを共導入した場合には、このような影響は見られず、体節中胚葉においてEGFP陽性細胞が均一に分布していた ( $n=65$ 個体; 図2 E, J)。

cMeso-1と同様に予定分節境界に沿って発現する転写因子Pax2 (図2B) (Suetsugu et al., 2002) の場合も、pCAGGS-Pax2とpCAGGS-EGFPを共導入した細胞において原腸陥入の異常が観察された ( $n=34$ 個体; 図2 G, L)。

また、RhoA (主に2次元培養系の研究において細胞骨格を制御する分子スイッチとして知られる低分子量Gタンパク質の1つ) (Hall, 2005) についても、CAGGSプロモーターによる体節中胚葉での解析を試みた。*in ovo* electroporationにより、pCAGGS-RhoAもしくはpCAGGS-caRhoA (a constitutively active form of RhoA) (Izawa et al., 1998)をpCAGGS-EGFPと共に予定体節中胚葉領域に導入して、24時間後に遺伝子導入胚を観察した。

しかし、pCAGGS-RhoAもしくはpCAGGS-caRhoAと一緒に導入したpCAGGS-EGFPから発現したはずのEGFPの蛍光は全く見られなかった (RhoA  $n=9$ 個体; 図2H, caRhoA  $n=8$ 個体; 図2I)。これらの結果から、体節中胚葉になる前にRhoA活性化細胞に異常が起き、アポトーシスした可能性が考えられた。

### (3) 体節中胚葉における分節境界誘導の分子機構を解明するため、 ニワトリ胚において遺伝子発現誘導システム (Tet-on) を確立した

pCAGGS-cMeso-1を原腸陥入前の予定体節中胚葉領域に導入すると、体節中胚葉になる前段階の原腸陥入が阻害されてしまった (図2G)。これでは、体節中胚葉におけるcMeso-1の役割を解析することができない。そこで、遺伝子発現の誘導時期を自由に制御できるシステム (Tet-on) (Furth et al., 1994; Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995; Hinrichs et al., 1994; Orth et al., 1998) をニワトリ胚で用い、原腸陥入前に導入した遺伝子を、原腸陥入後に発現させることを試みた。

3種類のプラスミド (pCAGGS-rtTA, pTRE-EGFP及びpCAGGS-DsRed2; 図3A) をニワトリ1日目胚 (Stage 8) の予定体節中胚葉領域へ共導入した。転写活性化因子rtTAは、doxycycline (tetracyclineの誘導體, 略称 Dox) が付くことにより構造が変化し、DNA上のターゲット配列であるtet responsive element (TRE) に結合できるようになる。そして、TREの両側に位置する2つの遺伝子の転写を活性化する。Doxを投与していない状態では、EGFP蛍光は数細胞でわずかにしか観察されなかった (図3B上のパネル)。Doxを投与後に、3時間して体節中胚葉においてははっきりEGFP蛍光が見られた ( $n=22$ 個体)。rtTAを改良したrtTA<sup>2s</sup>-M2 (Urlinger et al., 2000) の場合では、Doxを投与していない状態でのEGFP蛍光は全く観察されなかった ( $n=19$ 個体; 図3B下のパネル)。またDox投与後、時間を追うごとにEGFP蛍光度がrtTAの場合より強くなっていった。Western blotting法によりEGFPの発現量をDox投与後の時間経過ごとに調べ、相対値 (EGFP量/全タンパク質量) を出すと、Dox投与後12時間は3時間に比べて約2.7倍に発現量が増大していた (図3C)。また、異なるDox投与量での12時間後のEGFP蛍光度を比べた。50ngでわずかにEGFP蛍光が観察され、250 ng投与では、100  $\mu$ gと同程度の強いEGFP蛍光が観察された (それぞれ10個体; 図3D)。さらにpCAGGS-rtTA<sup>2s</sup>-M2 と pTRE-EGFPの割合を変えて比べたところ、2:1の割合に比べて1:2の割合において、より強いEGFP蛍光が認められた (それぞれ10個体; 図3E)。これらの実験結果が

ら、Tet-onによりニワトリ胚の原腸陥入後の体節中胚葉において、遺伝子発現の誘導時期と発現量を自由に制御できることが示された。以後の実験は、Dox投与量250 ng、pCAGGS-rtTA<sup>2s</sup>-M2 と pTRE-EGFPの割合 1:2 で行った。

#### (4) ニワトリ胚において遺伝子発現停止システム (Tet-off) を確立した

Tet-onに用いた3つのプラスミド (図3A) のうち、pTRE-EGFPのEGFPをd2EGFPに、pCAGGS-rtTAのrtTAをtTAに換えて、*in ovo* electroporationによって予定体節中胚葉に導入した (図4A)。tTAは、rtTAと違って通常の状態においてTREに結合し、d2EGFPの転写を活性化する。しかし、Doxが付くと、TREとの親和性がなくなり、d2EGFPの転写が止まる。d2EGFPは、タンパク質を分解に導くPRESTドメインをEGFPのC末端に融合した半減期2時間のEGFPである (CLONTECHniques, April, 1998)。Electroporationをして18時間経ってから、Dox投与直後はEGFP蛍光もDsRed2蛍光も同様に観察されるが、その後EGFP蛍光は徐々に弱まり、9時間で顕著に蛍光の衰弱し、15時間でほぼ完全に消失した ( $n=10$ 個体; 図4B)。これらの実験結果から、Tet-offによりニワトリ胚の原腸陥入後の体節中胚葉において、遺伝子発現の停止時期を自由に制御できることが示された。

#### (5) cMeso-1やPax2は体節中胚葉において細胞凝集を引き起こした

体節中胚葉におけるcMeso-1の役割を知るために、pCAGGS-cMeso-1を原腸陥入前の予定体節中胚葉領域に導入すると、cMeso-1強制発現細胞の原腸陥入が阻害された ( $n=34$ 個体; 図2 F, K)。

この問題を解決するために、pTRE-EGFP-cMeso-1 (図5A) を作成し、Tet-onにより、体節中胚葉になった細胞においてcMeso-1を発現させた。Dox投与後、時間を追って観察すると、3時間後にcMeso-1強制発現細胞 (cMeso-1; 図5B上のパネル) は、pTRE-EGFPの場合と同じように、体節中胚葉において均一に散らばっていた (Control EGFP; 図3B下のパネル)。しかし、6時間すると、徐々にcMeso-1強制発現細胞同士で凝集し始めた。12時間後には、特に神経管の脇に接する位置に凝集塊を形成していた ( $n=25$ 個体; 図5B上のパネル)。このことから、cMeso-1発現細胞同士はある種の接着因子を発現して、互いに集まっている可能性が考えられた。

正常発生過程において、cMeso-1発現部位で発現を開始する接着因子として、NCAMとN-cadherinが知られている (Duband et al., 1987)。そこで、cMeso-1

がNCAMとN-cadherinの発現を誘導するのかを、pTRE-EGFP-cMeso-1を導入した体節中胚葉の横断切片においてNCAMとN-cadherinの抗体染色をすることによって調べた。その結果、cMeso-1を強制発現させた細胞において、強いNCAMのシグナルが異所的に認められた ( $n=16$ 個体; 図5C)。一方、N-cadherinの発現には、異常は見られなかった ( $n=9$ 個体; 未公表データ)。また、Control実験であるpTRE-EGFPの場合には、異所的なNCAMのシグナルは認められなかった ( $n=31$ 個体; 図5C)。これらのことから、体節中胚葉においてcMeso-1がNCAMの発現を誘導し、細胞凝集を引き起こすことが示唆された。

pCAGGS-Pax2も、pCAGGS-cMeso-1と同様に、原腸陥入前の予定体節中胚葉領域に導入すると、Pax2強制発現細胞の原腸陥入が阻害された ( $n=25$ 個体; 図3 G, L)。そこで、pTRE-EGFP-Pax2 (図5AのcMeso-1をPax2に入れ換えたコンストラクト) を作って、Tet-onにより、体節中胚葉になってから、Pax2を発現させた。Dox投与して8時間後にPax2強制発現細胞 (図5B下のパネル) は、pTRE-EGFPの場合と同じように、体節中胚葉において均一に散らばっていた。しかしながら、そのあと徐々にPax2発現細胞は凝集し、16時間後になると、凝集塊をつくっていた ( $n=29$ 個体; 図5B下のパネル)。特に内胚葉と接するように腹側へ集まっていた (図5C)。このことから、Pax2発現細胞同士も接着因子NCAMを発現して、互いに集まっている可能性が考えられた。

そこで、cMeso-1と同様にPax2がNCAMの発現を誘導するのかを、pTRE-EGFP-Pax2を導入した体節中胚葉の横断切片においてNCAMの抗体染色をすることによって調べた。その結果、Pax2強制発現細胞において、異所的にNCAMのシグナルが認められた ( $n=18$ 個体; 図5C)。これらの結果から、体節中胚葉においてPax2がNCAMの発現を誘導し、細胞凝集を引き起こすことが示唆された。

#### (6) cMeso-1はPax2を介してNCAMを誘導し、細胞凝集を引き起こした

cMeso-1も、Pax2も、それぞれ体節中胚葉においてNCAMの発現を誘導し、細胞凝集を引き起こした (図5 B, C)。これらのことから、NCAMの発現誘導においてcMeso-1とPax2の間に何らかの関係があることが予想された。正常発生過程においても、cMeso-1はPax2より少し早くに発現を開始するものの、どちらも同じレベル-1後方に沿って発現する (図2 A, B)。そこで、cMeso-1がPax2の発現を誘導するかどうかを、Tet-onによりcMeso-1とEGFPを共に強制発現させた体節中胚葉の横断切片においてPax2とNCAMの抗体染色をすることによって調べた。その結果、cMeso-1とEGFPを強制発現させた細胞にお

いて、強いPax2とNCAMのシグナルが異所的に認められた ( $n=17$ 個体; 図6A下パネル)。逆にTet-onでPax2とEGFPを強制発現させたときには、NCAMの発現は誘導されたが、cMeso-1の発現は誘導されなかった ( $n=13$ 個体; 未公表データ)。これらの結果から、体節中胚葉においてcMeso-1はPax2の発現を誘導し、Pax2を介してNCAMの発現を誘導することが示唆された。

さらに、cMeso-1によるNCAMの発現誘導にPax2が必要なのかどうかを明らかにするために、cMeso-1強制発現細胞内でPax2の発現を阻害した条件下において、NCAMの発現を調べた。Pax2の発現を阻害する方法としては、RNAiを利用した。そのため、Pax2のORF内における別々の配列を含む2種類のshort-hairpin RNA (shRNA) 発現プラスミド (Pax2-shRNA #600, #701) を作成した (図6B)。まず、Pax2-shRNAによって本当にPax2の発現が抑えられるのかを、DF-1 (ニワトリ繊維芽細胞株) にPax2-shRNA発現プラスミド、pCAGGS-rtTA2<sup>s</sup>-M2とpTRE-EGFP-Pax2を共導入し、Dox添加後12時間インキュベーションを行い、Western blottingによって確認した。Contor1-shRNA (ターゲットの存在しないshRNA) に比べて、Pax2-shRNAを導入した細胞におけるPax2の発現量は、著しく低かった (#600  $n=3$ 回; 図6C) (#701  $n=3$ 回, 未公表データ)。これらのデータから、Pax2-shRNAがPax2の発現を阻害するのに利用可能であることが示された。次に、体節中胚葉においてpCAGGS-rtTA2<sup>s</sup>-M2, pTRE-EGFP-cMeso-1とPax2-shRNAを共導入し、Doxを添加後12時間で未分節中胚葉の横断切片を作成し、Pax2及びNCAMの発現を抗体染色によって調べた。その結果、cMeso-1発現細胞において、Pax2の発現はほぼ見られず、RNAiによりPax2の発現が阻害されていることが確認された (#600  $n=11$ 個体, #701  $n=8$ 個体; 図6D下のパネル)。さらに、NCAMの発現も認められなかった (#600  $n=11$ 個体, #701  $n=8$ 個体; 図6D下のパネル)。これらのデータから、体節中胚葉においてcMeso-1によるNCAMの発現誘導にPax2が必要であることが示唆された。

また、cMeso-1強制発現細胞においてPax2の発現を阻害すると、凝集能が著しく低下することが解った。それでも、Pax2-shRNAとcMeso-1を共発現させた細胞同士のわずかな凝集塊が残っていた。この凝集において、NCAM以外の接着因子が関与していないかを確認するために、これらの細胞においてN-cadherinやE-cadherinの発現も調べた。結果としては、N-cadherinやE-cadherinの発現に変化はなかった (図6D下のパネル, #600  $n=11$ 個体, #701  $n=8$ 個体)。これらの結果から、cMeso-1下流においてPax2とは別の経路で、NCAM, N-cadherinやE-cadherin以外の接着因子が細胞凝集に寄与している可能性が考えられた。しかしながら、Pax2-shRNAによって阻害しきれなかつ

たPax2の下流で、若干のNCAMが発現し、細胞凝集に寄与している可能性も否定できない。

#### (7) RhoAの活性は体節中胚葉において細胞死を引き起こした

体節中胚葉におけるRhoAの役割を知るために、pCAGGS-RhoAやpCAGGS-caRhoAをpCAGGS-EGFPと共に原腸陥入前の体節中胚葉予定領域に導入すると、24時間経っても一緒に導入したpCAGGS-EGFPから発現したはずのEGFP蛍光は、ほとんど観察されなかった (図2 H, I)。おそらく原腸陥入の異常により、細胞死が起こったと予想された。

この問題を解決するために、pTRE-EGFP-RhoA (図7A) を作って、Tet-onにより、体節中胚葉になってから、RhoAを発現させた。すると、Dox投与して12時間後にEGFP蛍光は体節中胚葉に見られたが、24時間後にほとんど消失していた ( $n=15$ 個体; 図7B)。

このことから、RhoA発現細胞が細胞死を起こしている可能性が考えられたので、pTRE-EGFP-caRhoAを導入した体節中胚葉の縦断切片において、抗active-Caspase3抗体によってApoptosis細胞の検出を行った。その結果、controlのEGFPのみを発現させた細胞におけるactive-Caspase3陽性細胞の割合に比べて、caRhoA発現細胞におけるactive-Caspase3陽性細胞の割合は有意に多く認められた (control EGFP 3.5 +/- 2.3%, caRhoA 27 +/- 9.3%; 図7 C, D)。これらのデータから、体節中胚葉において、RhoAの活性が細胞死を引き起こしていることが示唆された。

#### (8) cMeso-1発現細胞はセグメンター活性を示した

次に、体節中胚葉においてcMeso-1が Pax2を介して細胞凝集を引き起こすことが、セグメンター活性の原動力になっているのかを調べるために、Tet-on systemと組織移植を組み合わせることによって、体節中胚葉において異所的にcMeso-1やPax2それぞれの発現境界をつくり (セグメンター・アッセイ, 図8A)、これらの発現境界が分節化誘導に果たす役割を調べた。セグメンター・アッセイの手順としては、最初に予定体節中胚葉領域へ3種類のプラスミド (pTRE-EGFP-cMeso-1、pCAGGS-rtTA2<sup>S</sup>-M2 及び pCAGGS-DsRed2, 図8A) を *in ovo* electroporationにより共導入する。次にelectroporationをされた組織の一部を切り取り、electroporationされていない別の胚の本来分節しない部位へと組織片を移植する。それからDoxを投与し、発現を誘導することによ



って、異所的な遺伝子の発現境界ができあがる。なお、発現を誘導した遺伝子が機能するまでのタイムラグを考慮して、移植する1時間前のドナー胚においても、Dox溶液を投与した。

セグメンター・アッセイを行った結果、cMeso-1の発現境界に沿って異所的な境界が形成された ( $n=44$ 個体/ $59$ 個体; 図8B)。しかも、その効率は74%だった。これに対し、Pax2やControl EGFPの場合には、そのような影響は全く見られなかった (Pax2  $n=0$ 個体/ $10$ 個体, Control EGFP  $n=0$ 個体/ $60$ 個体; 図8B)。これらの結果から、cMeso-1発現細胞は、セグメンター活性を示すことが明らかになった。

#### (9) cMeso-1は、体節中胚葉において *EphA4*, *PAPC* 及び *Sox9* の発現を誘導した

Pax2発現細胞がセグメンター活性を示さなかったことから、分節境界形成過程のcMeso-1の下流においてPax2以外に必要な因子があるのではないかと考え、その探索を行った。レベル-1後方において特異的に発現する遺伝子を集めた (図9A)。EphA4 (チロシンキナーゼ型受容体) (Barrios et al., 2003; Durbin et al., 1998; Durbin et al., 2000; Hirano et al., 1998; Suetsugu et al., 2002), PAPC (Paraxial protocadherin, 接着因子) (Kim et al., 2000; Rhee et al., 2003; Yamamoto et al., 1998), Sox9 (SRY関連HMG-box型転写因子) (Healy et al., 1996; Healy et al., 1999; Sakai et al., 2006; Wright et al., 1995) 及び Tbx18 (T-box型転写因子) (Tanaka and Tickle, 2004), これらの遺伝子は、レベル-1後方においてcMeso-1より遅く発現する。これらの遺伝子がcMeso-1の下流に位置するのかを調べるために、electroporationによってcMeso-1及びEGFPを未分節中胚葉において強制発現させ、これらの遺伝子の異所的な発現誘導の有無をwhole mount *in situ* hybridization で調べた。その結果、cMeso-1強制発現細胞において、異所的に*EphA4*, *PAPC*及び*Sox9*の発現が誘導された (*EphA4*  $n=9$ 個体, *PAPC*  $n=8$ 個体, *Sox9*  $n=9$ 個体; 図9B)。しかし、Tbx18の発現は誘導しなかった ( $n=8$ 個体; 図9B)。Control EGFPの場合にも、このような発現誘導は見られなかった。

#### (10) *EphA4*発現細胞はセグメンター活性を示した

Tbx18は、すでに田中幹子博士らによってセグメンター活性に関わることが示されている (Tanaka and Tickle, 2004)。その他の3つの遺伝子*EphA4*, *PAPC*

及びSox9がセグメンター活性と関わっているのかを調べるため、これらの遺伝子についてセグメンター・アッセイ (図8A) を行った。

3つの遺伝子の中でEphA4だけがセグメンター活性を示した ( $n=19$ 個体/ $26$ 個体, 73%; 図10)。PAPCと Sox9の場合では、このような影響は見られなかった (PAPC  $n=0$ 個体/ $16$ 個体 0%. Sox9  $n=0$ 個体/ $8$ 個体 0%; 図10)。これまでの結論をまとめると、レベル-1においてcMeso-1の下流因子としてEphA4, PAPC, 及びSox9があり、その中でEphA4だけがセグメンター活性を起こすのに十分であることが示された。

### (11) EphA4は体節中胚葉においてNotch signalingを活性化しなかった

セグメンター活性には、受容体Notchを介したsignalingが関わっていることも報告されている (Sato et al., 2002)。そこで、今回セグメンター活性との関わりが明らかになったEphA4やTbx18がNotchを活性化するかどうかについても知りたいと考えた。このことを明らかにするため、Notchレポーター (TP-1-Venus) を使用した (図11A)。このレポーター遺伝子のVenus (改良型YFPをコードしている) (Nagai et al., 2002) は $12 \times$  RBP-J  $\kappa$  responsive element (Kato et al., 1997)によって転写制御されている。故に、このレポーターは切断されたNotchとDNA結合タンパク質RBP-J  $\kappa$  (Hamaguchi et al., 1991; Kawaichi et al., 1992; Tamura et al., 1995) の複合体に応答してVenusを発現する。これまでにNotchレポーターによっていくつかの組織でNotch活性の検出が行われてきた (Kohyama et al., 2005; Matsuda et al., 2005; Tokunaga et al., 2004)。

EphA4及びTbx18によってセグメンター活性を引き起こしたとき、Notchレポーターの活性が上がるかどうかを調べた。そのために、これらの遺伝子それぞれと、Notchレポーター及びpCAGGS-DsRed2をelectroporationにより共導入し、セグメンター・アッセイを行った。遺伝子導入された細胞は全てDsRed2 (赤色) でラベルされている。その結果、EphA4及びTbx18によりそれぞれ異所的は分節境界が誘導されているが (図11B各パネル左側)、EphA4や Tbx18を強制発現させた細胞においてcontrol (遺伝子を挿入していない発現ベクターを用いた) と同様にNotchレポーターの活性上昇が検出されなかった (control  $n=10$ 個体, EphA4  $n=8$ 個体, Tbx18  $n=7$ 個体; 図11Bパネル右側)。なお、caNotch (a constitutively active form of Notch; Notch1  $\Delta$  E) (Schroeter et al., 1998) を用いて、同じ実験を行ったときは、Notchレポーターの活性上昇が確認された ( $n=6$ 個体; 未公表データ)。これらのデータから、体節中胚

葉のレベル-1においてEphA4や Tbx18の下流でNotchは活性化しないことが示唆された。

#### (12) Notch signalingは、体節中胚葉においてEphA4の発現に必要十分である

体節中胚葉においてEphA4はNotch signalingを活性化しないことが解った。それでは、逆にNotch signalingが体節中胚葉においてEphA4の発現を誘導するのではないかと考え、caNotchを用いて実験を行った。caNotchを体節中胚葉に発現させてEphA4の発現を*in situ* hybridizationで調べると、caNotch発現細胞においてEphA4の発現が異所的に観察された ( $n=9$ 個体; 図12A)。Tbx18やPax2では、このような影響は見られなかった (Tbx18  $n=9$ 個体, Pax2  $n=8$ 個体; 図12A)。これらのデータから体節中胚葉においてNotch signalingはEphA4の発現が誘導するのに十分であることが示された。

次に、レベル-1付近におけるEphA4の発現にNotch signalingが必要なのかについてdnRBP (a dominant negative form of RBP-J $\kappa$ ; RBP-J $\kappa$  R218H) (Chung et al., 1994) を用いて実験を行った。dnRBPはDNA結合領域に変異が入っており、内在的RBP-J $\kappa$ と競合して活性型Notchと複合体を作り、Notch signalingを阻害する。そのdnRBPを未分節中胚葉で発現させる際、未分節中胚葉後方のSegmentation clock (Bessho and Kageyama, 2003; Giudicelli and Lewis, 2004) におけるNotch signalingへの影響を避けるため、pTRE-EGFP-dnRBPを作成し、Tet-onによりレベル-1付近においてdnRBPを発現させ、EphA4の発現を*in situ* hybridizationを用いて調べた。レベル-1後方におけるdnRBP導入細胞中のEphA4の発現は、周りの正常細胞に比べて明らかに減少していた ( $n=7$ 個体; 図12B)。これらの結果から、レベル-1後方におけるNotch signalingは EphA4の発現に必要であることが推測された。

#### (13) cMeso-1 が分節境界を誘導するのに、EphA4 以外の細胞間シグナル伝達因子が存在する可能性がある

cMeso-1 が分節境界を誘導するのに、EphA4 が必要なのかを調べるために、cMeso-1 発現細胞において、RNAiによりEphA4の機能阻害を行った。

その結果、cMeso-1 発現細胞において、RNAiによりEphA4の発現は落ちていたが、分節境界の誘導は起こった ( $n=3$  個体/5 個体, 60%; 図 13)。これらのデータから、cMeso-1 が分節境界を誘導するのに、EphA4 意外にも細胞

間シグナル伝達を補正している分子がある可能性が示された。

#### (14) ephrinB2 reverse signaling は分節境界誘導に必要十分である

cMeso-1発現細胞において、EphA4の機能阻害をしても分節境界の誘導が起こることから、EphA4以外にも細胞間シグナル伝達を補正している分子がある可能性が出てきた。しかし、少なくとも膜タンパク質EphA4はセグメンター活性を起こす上で、細胞間のシグナル伝達をしていることが、EphA4発現細胞がセグメンター活性を示すことから解る (図10)。そこで、最後の問いとして、EphA4はどのようにして分節境界の形成を引き起こすのかを調べた。以前から受容体Ephとそのリガンドephrinを介したsignalingは、後脳の境界形成や培養細胞においてそれぞれを発現している細胞間で反発し、cell-sortingを引き起こすことがよく知られている (Janes et al., 2005; Mancina and Shapiro, 2005; Marston et al., 2003; Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1999; Zimmer et al., 2003)。体節中胚葉の分節化の際にも、cell-sortingらしき細胞挙動がtime-lapseによって観察されている (Kulesa and Fraser, 2002)。これはEph/ephrin signalingによる細胞間反発の結果であることが予想された。このEph/ephrin signalingは一定の条件下で双方向性があり、Eph発現細胞内にシグナルが伝わる以外に、リガンドephrinは受容体としても働き、ephrin発現細胞内にもシグナルが伝わる (図14A) (Kullander and Klein, 2002)。これをephrin reverse signalingと言う。ニワトリ胚の未分節中胚葉の前方ではephrinB2が幅広く発現している (図14B)。ephrinB2は、ほぼ全てのEph familyのメンバー (EphAタイプとEphBタイプ両方) と結合する (Holder and Klein, 1999; Palmer et al., 2002; Wilkinson, 2001)。そこで、ephrinB2とEphA4の結合によるEph forward signaling と ephrin reverse signalingの両方が分節境界誘導に必要なのか、片方で十分なのかを調べるために、まず細胞内domainが欠損したEphA4、EphA4 $\Delta$ ICDを用いて実験を行った。このEphA4 $\Delta$ ICDは、隣の細胞のephrin reverse signalingを活性化するが、EphA4 $\Delta$ ICD発現細胞のEph forward signalingに対しては不活性である (Barrios et al., 2003)。このEphA4 $\Delta$ ICDを用いてセグメンター・アッセイを行った。その結果、EphA4 $\Delta$ ICDの発現境界に沿って、異所的な分節境界が形成された ( $n=10$  個体/15個体, 66%; 図14C)。したがって、分節境界の形成にはephrin reverse signalingで十分であり、EphA4 forward signalingは必要ないことが明らかになった。

さらに、分節境界の形成におけるephrin reverse signalingの必要性を検証

するために、今度はEphの相手方であるephrinB2と、このephrinB2の細胞内 domainを欠損したisoform、ephrinB2 $\Delta$ ICDを用いて実験を行った。ephrinB2 $\Delta$ ICDは、ephrinB2 $\Delta$ ICD発現細胞のephrin reverse signalingに対して不活性であるが、隣の細胞のEph forward signalingを活性化する (Barrios et al., 2003)。このephrinB2 $\Delta$ ICDと正常なephrinB2をそれぞれ用いて、セグメンター・アッセイを行った。その結果、正常なephrinB2の発現境界においては、異所的な分節境界が形成されたが ( $n=10$ 個体/ $14$ 個体, 71%, 図14D)、ephrinB2 $\Delta$ ICDの発現境界においては、何の影響も見られなかった ( $n=0$ 個体/ $12$ 個体, 0%; 図14E)。これらの結果から、分節境界の形成にはephrinB2 reverse signalingが必要であり、Eph forward signalingは十分でないことが示唆された。

## (15) 考察

### ニワトリ胚におけるTet-onとTet-offの確立

Tet-onやTet-offは、遺伝子発現を制御する上で有用な系として今まで培養細胞 (Gossen et al., 1995) やマウス (Furth et al., 1994) において使われてきた。本研究では、ニワトリ胚において初めてTet-onの利用を試みた。その結果、ニワトリ胚の利点である胚操作の容易さと組み合わせることにより、未分節中胚葉のレベル-1付近という極めて局所的な部分における遺伝子の役割を調べることに成功した。本研究におけるcMeso-1に限らず、Notch signaling、分泌型リガンドWntやFgf8を介したsignalingも予定体節中胚葉細胞が未分節中胚葉のレベル-1付近の細胞になるまでに、繰り返し使われ複数の役割を演じていることが示唆されている (Aulehla and Herrmann, 2004; Galceran et al., 2004; Giudicelli and Lewis, 2004; Ito et al., 2007; Meyers et al., 1998; Morimoto et al., 2005; Satoh et al., 2006)。これらのsignalingに関わる遺伝子の別々時期における複数の役割をそれぞれ分けて理解する上で、有効かつ簡便な実験手法として、ニワトリ胚におけるTet-onを利用した解析が今後も期待される。

また本研究においては、遺伝子の発現を自由に誘導できるTet-onと共に、遺伝子の発現を自由に停止できるTet-offについてもニワトリ胚において利用可能であることが証明された。Tet-offの用途としては、例えば遺伝子の発現を停止してからどれくらいでmRNAやタンパク質が分解されるのかを調べることにより、mRNAやタンパク質の安定性を解析できる (Hilgers et al., 2005)。

また遺伝子発現の停止時期を変えることにより、特定の発生現象において、ある遺伝子がどの時期まで発現していることが必要なのか、もしくは、どの時期以降発現してはいけないのかといったことも解析することが可能である。

さらに、Tet-onやTet-offは時期組織特異的なgain of functionの実験だけでなく、今回用いたdnRBPのようなDominant negative typeのコンストラクトや、shRNAとshRNA発現用プロモーター (U6プロモーター等) を組み込むことによって (Fei et al., 2007; Li et al., 2007)、時期組織特異的なloss of functionの実験にも使える。

そのほか、近年ニワトリ胚において新たに確立された実験手法としては、Tol2 (メダカにおいて発見されたトランスポゾン) (Koga et al., 1996; Urasaki et al., 2006) とそのトランスポゼース (Kawakami et al., 2000) を用いて、ゲノム内に外来遺伝子を挿入することに成功している (Sato et al., 2007)。従来のpCAGGS-EGFPでは、予定体節中胚葉導入後にEGFP蛍光を4日目以降は確認できなかった。しかし、Tol2配列でCAGGS-EGFPを挟み、トランスポゼースでゲノム内に挿入することにより、4日目以降においても安定してEGFP蛍光が観察されるようになった。このTol2とTet-onを組み合わせることにより、発生後期の特定の組織における遺伝子の役割の解析が可能になった (Sato et al., 2007)。このTol2トランスポゾンの系は、ニワトリに限らず、マウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュなど脊椎動物全般で機能することが証明されている (Kawakami, 2005; Kawakami et al., 2004a; Kawakami and Noda, 2004; Kawakami et al., 2004b)。

また、最近解読されたニワトリのゲノム情報を利用したプロモーター解析も有用である (Uchikawa et al., 2003; Uchikawa et al., 2004)。このような解析によって同定したプロモーターを用いて、特定の時期や組織において遺伝子を発現させることもできる。この遺伝子操作もニワトリ胚の利点である胚操作の容易さと組み合わせることにより、極めて局所的な部分における遺伝子の役割を調べることができる。

### **cMeso-1はPax2を介してNCAMを誘導し、細胞凝集を引き起こす**

本研究で、Tet-on を用いて cMeso-1 を強制発現させた体節中胚葉細胞同士は、凝集していた (図 5B 上パネル)。このような凝集現象は Pax2 を強制発現させた体節中胚葉細胞においても見られた (図 5B 下パネル)。そして、cMeso-1 は Pax2 を介して NCAM の発現を誘導し、細胞凝集を引き起こしていることも、本研究から解った。この細胞凝集誘導がセグメンター活性に関わっている



ことが期待された。しかしながら、Pax2 発現細胞はセグメンター活性を示さなかった (図 8B)。つまり、Pax2 による細胞凝集能はセグメンター活性には十分でなく、分節境界誘導に直接は結びつかない可能性が高い。本来 cMeso-1 や Pax2 はレベル-1 後方において一過的にほぼ体節一個分の領域に発現する (図 2 A, B) (Buchberger et al., 1998; Suetsugu et al., 2002)。 (Duband et al., 1987)。ここから考え得る説として、Pax2 を介した細胞間接着機構は一体節を形成する細胞同士が凝集するために働いていると考えられる。今後の解析としては、レベル-1 後方における内在的な Pax2 機能を阻害したときに、NCAM の蓄積や細胞凝集力が失われるのかを調べることも必要である。

また、体節形成においてだけでなく原腸陥入においても cMeso-1 は Pax2 を介して NCAM を誘導し、細胞凝集を引き起こす可能性がある。本研究において、cMeso-1 の過剰発現により予定体節中胚葉の原腸陥入が阻害された。cMeso-1 のマウスホモログ Mesp1 と Mesp2 のダブルノックアウトマウスにおいても、原腸陥入に異常が見られる (Kitajima et al., 2000; Saga et al., 1996)。これらのことは、原腸陥入には cMeso-1 の厳密な発現量の制御が必要であることを示している。この厳密な発現制御の下流で働く候補因子の一つとして接着因子が上げられる。既知の報告としては、ゼブラフィッシュ胚の原腸陥入が起こる際、中胚葉細胞群が効率よく正しい位置に移動するために接着因子 E-cadherin を用いて、中胚葉細胞同士が集まったまま行動していることが解っている (Babb and Marrs, 2004; Montero et al., 2005; Shimizu et al., 2005)。この場合と同様に、原腸陥入が起こる際、NCAM が中胚葉細胞群を集める役割を担っていることが予想される。今まで原腸陥入期付近における NCAM の役割としては、主に予定神経管細胞同士の接着であると考えられてきた (Hansen et al., 1997; Jacobson and Rutishauser, 1986; Xu et al., 1995)。本研究の結果は、原腸陥入期の中胚葉における NCAM の新たな役割を示しているのかもしれない。

## RhoAの活性は細胞死を引き起こす

体節中胚葉においてRhoAの活性は体節中胚葉においてCaspase3を活性化し、細胞死を引き起こすことが解った。このRhoA のCaspase3を介した細胞死は、2次元培養系の心筋細胞においてよく研究されている (Chang et al., 2006; Coleman and Olson, 2002; Del Re et al., 2007)。今回、このアポトーシス経路が生体内でも働いている可能性が示された。体節中胚葉において、このアポトーシス機構が実際どのような目的のために働いているのかは非常に興味深

い。おそらく体節中胚葉の分化過程における特定細胞種の数や配置を制御するために使われているのではないかと考えられる (Borycki et al., 1999; Miller and Briglin, 1996; Sanders, 1997; Sanders and Parker, 2001)。RhoAと同じくRho familyに属するRac及びCdc42は、RhoAのような細胞死の誘導ではなく、体節形成時の間充織-上皮転換に関わっていることが解っている (Nakaya et al., 2004; Takahashi et al., 2005)。

また、体節中胚葉だけでなく原腸陥入時の予定体節中胚葉においても、caRhoA強制発現細胞が消失した。本来の原腸陥入においてもRhoAを介した細胞死が起こっている可能性がある (Miller and Briglin, 1996)。しかし、これとは別にRhoAが原腸陥入の際に起こる上皮-間充織転換や細胞移動を制御しているという報告もある (Fuse et al., 2004; Jopling and den Hertog, 2005; Zhu et al., 2006)。おそらくRhoA活性の強度によって、細胞挙動が異なってくるのではないかと考えられる。今後Tet-on system用い caRhoAの発現量を制御することによって、このような問題にアプローチできる。

#### 分節境界誘導においてcMeso-1はEphA4の発現を誘導する

未分節中胚葉においてcMeso-1は、*EphA4*の発現を誘導するのに十分であることが示された。他にも*EphA4*の発現がMesp2/cMeso-1に依存するという報告 (Nomura-Kitabayashi et al., 2002) や*EphA4*のプロモーターにMesp2/cMeso-1が直接結合し、*EphA4*の転写を活性化するという報告もある (Nakajima et al., 2006)。また、Mesp2/cMeso-1のプロモーターに切断NotchとRBP-J $\kappa$ の複合体が直接結合し、Mesp2/cMeso-1の転写を活性化するという知見 (Yasuhiko et al., 2006) と合わせて考えると、本研究におけるNotch signaling活性による*EphA4*の発現誘導もcMeso-1を介したものである可能性がある。このことを調べるために、現在caNotchによってNotchを活性化したときに*EphA4*だけでなくcMeso-1の発現も誘導されていないかどうかや、dnRBPによってNotch signalingを阻害したときに内在的な*EphA4*の発現だけでなくcMeso-1の発現も減少していないかどうかについて解析中である。このとき、cMeso-1の発現誘導を満たす条件として、Notch signalingとTbx6の協調作用や (Yasuhiko et al., 2006)、Fgf8 signalingとレチン酸 signalingの下流に位置するSnail (Zinc finger型転写因子) によるcMeso-1の発現抑制も考慮する必要がある (Chan et al., 2006; Dale et al., 2006; Delfini et al., 2005; Diez del Corral et al., 2003; Dubrulle et al., 2001; Morales et al., 2007; Sawada et al., 2001; Vermot and Pourquie, 2005)。一方で、外胚葉



からの分泌因子Wnt6 (Schmidt et al., 2004) などのシグナルによってParaxis (bHLH型転写因子) (Burgess et al., 1995) を介した分節境界形成における間充織-上皮転換 (Burgess et al., 1996; Correia and Conlon, 2000; Susic et al., 1997) やEphA4の発現の維持が行われているという知見もあり (Johnson et al., 2001; Schmidt et al., 2001)、このシグナルがcMeso-1と協調してEphA4の発現を誘導していることも予想される。

本研究から、EphA4を強制発現させた細胞がセグメンター活性を引き起こすことが解った (図10)。ゼブラフィッシュにおいてもEphA4の機能阻害により分節化境界の形成異常が報告されている (Durbin et al., 1998)。また、Mesp/cMeso-1とEphA4の発現が消失しており分節構造ができない変異体 (*fused somite*) において、モザイク状にEphA4を発現させると、発現境界に沿って分節化が起こるという、今回の結果に類似した報告もある (Durbin et al., 2000)。これらの証拠から、脊椎動物胚の未分節中胚葉における分節境界形成の際、EphA4がセグメンター活性の実行部隊として細胞間のシグナル伝達を担っている可能性が高い。

### **ephrinB2 reverse signaling活性は、セグメンター活性の分子実体である**

EphA4により前方の隣接した細胞で活性化されるEphrinB2 reverse signalingは分節境界形成を引き起こすのに必要十分である (図14)。したがって、このEphrinB2 reverse signaling活性こそがセグメンター活性の分子実体であると結論づけられた。

EphA4 はレベル-1 後方特異的に発現しているのに対して、ephrinB2 はレベル-1 をまたいで前後に幅広く発現している (図 14B)。この状況下でレベル-1 前方の ephrinB2 にだけシグナルが伝わる理由として、EphA4 と ephrinB2 両方を発現している細胞では EphA4 forward signaling と ephrinB2 reverse signaling の両方が阻害されるという報告が当てはまる (Foo et al., 2006; Poliakov et al., 2004; Yin et al., 2004)。それで、ephrinB2 しか発現していないレベル-1 前方の細胞にだけ ephrin reverse signaling が伝わると考えられる。また、cMeso-1 や caNotch を導入した未分節中胚葉組織片の前後を逆にしてセグメンター・アッセイを行っても、移植した遺伝子導入組織片の前側で分節境界誘導が起こることから (未公表データ)、受け手側の ephrinB2 に方向性があると考えられる。ephrinB2 の方向性の実体として次の2つのことが考えられる。1つ目は、ephrin の細胞膜上の密度に依存した Eph との結合能

の変化により (Stein et al., 1998)、ephrinB2 が適度に発現している前側の細胞が EphA4 からの誘導シグナルを受け易くなっている可能性である。もう一つは、ある種の細胞においては1細胞の細胞膜上で ephrin がクラスターをつくり偏って存在していることから (Marquardt et al., 2005)、レベル-1 付近においても細胞膜上で ephrinB2 が後方に偏って存在しており、前側の細胞だけが後ろから来る EphA4 による誘導シグナルを受け取れるということも考えられる。マウスの眼の形成過程においては、ephrinB1 が Wnt11 と協調して、細胞極性を制御するシグナル経路として有名な Planar cell polarity (PCP) pathway を活性化しているという報告もある (Lee et al., 2006; Poliakov and Wilkinson, 2006)。この PCP pathway によって ephrinB2 の1細胞の細胞膜上での局在が維持されていることが期待される。レベル-1 付近で ephrinB2 と協調して働く Wnt の候補としては、外胚葉で発現している Wnt11 (Tonegawa et al., 2003) や Wnt6 (Schmidt et al., 2004) などがある。本研究で着目した後ろから前への誘導シグナル以外にも、その前段階として働くことが知られる腹側から背側への分節境界誘導能の伝染にも (Sato and Takahashi, 2005)、背側からの Wnt signaling と EphA4/ephrinB2 signaling の協調作用が関わっているかもしれない。

このような方向性を伴った ephrinB2 reverse signaling の活性により、レベル-1 前方の細胞が、最終的に体節の間にギャップを作り出す細胞挙動を起こしているはずである。2次元培養細胞系における今までの知見から、Eph と ephrin が結合した付近の細胞膜で endocytosis が起こり、そこで細胞同士の接着がはずれていることが解っている (Wilkinson, 2003; Zimmer et al., 2003)。おそらくレベル-1 で分節境界形成が起こるときも、活性化した ephrinB2 の周辺にある NCAM などの接着因子も一緒に endocytosis され、その面だけで接着力が失われてギャップの元ができるのではないかと考えられる。培養細胞系において endocytosis には、低分子量 G タンパク質である Rho, Rac や Cdc42 の活性が必要であることも解っている (Ellis and Mellor, 2000)。このような endocytosis による細胞接着の解除が、未分節中胚葉という3次元生体内でも普遍的なものであるのかは、非常に興味深い。ephrinB2 reverse signaling の下流で endocytosis を引き起こす候補因子の一つとして、ephrinB タイプの細胞内リン酸化部位に SH2 (Src homology 2) ドメインを介して結合する Src や Grb4 (growth factor receptor bound 4) などのアダプタータンパク質がある (Kullander and Klein, 2002)。Grb4 は Rac や Cdc42 の活性等を介して、細胞骨格の制御を行っている (Cowan and Henkemeyer, 2001)。これらの知見は、2次元培養系のマウス神経芽細胞腫瘍株 (NG108-15) を用いて得られている。

さらに、SrcやGrb4はFAK (focal adhesion kinase) にも作用することが知られている (Cowan and Henkemeyer, 2001; Foo et al., 2006)。アフリカツメガエルの体節形成の際、FAKとVASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein; actin制御タンパク質) は協調して細胞膜上のIntegrinを介した細胞移動や細胞形態の制御を行なっている (Kragtorp and Miller, 2006)。また、ephrinB2は、ephrinB2発現細胞膜上のIntegrinと細胞外マトリックスとの結合を促進することも解っている (Meyer et al., 2005)。このIntegrinの作用は細胞間反発の際に起こる細胞移動に携わるだけでなく、細胞間反発によってできた細胞間のギャップ内に細胞外マトリックスを呼び込み、境界を維持することにも関わっていると考えられる (Koshida et al., 2005)。さらに、マウスやゼブラフィッシュにおいてIntegrin  $\alpha 5$  を介したsignalingが、分節境界形成の際に起こる間充織-上皮転換にも関わっていることが解ってきている (De Arcangelis and Georges-Labouesse, 2000; Goh et al., 1997; Koshida et al., 2005; Yang et al., 1999)。EphA4/ephrinB2 signalingも間充織-上皮転換に関わっているという報告がある (Barrios et al., 2003; Schmidt et al., 2001)。さらに分節境界形成における間充織-上皮転換には、Rac1とCdc42が関わっていることも解っている (Nakaya et al., 2004)。今後、分節化におけるephrinB2 reverse signalingを解析することで、ギャップ形成や間充織-上皮転換においてRac1とCdc42等がどのように使い分けられているのかが解明されるであろう。

またephrinBタイプの細胞質内領域におけるもう一つの保存されたモチーフとしてPDZ結合ドメインがある。PDZ結合ドメインを介したephrinB1 reverse signalingは、誘因物質SDF-1 / 受容体CXCR4による小脳顆粒神経細胞の移動の抑制を行っている (Lu et al., 2001)。未分節中胚葉においてもCXCR4の発現が見られることから (Tonegawa et al., 2003)、ephrinB2のPDZ結合サイトを介した何らかの細胞挙動制御に関わることを期待される。

### 分節境界形成における様々な細胞間シグナルの関与

Tbx18はセグメンター活性を引き起こすことができるが (Tanaka and Tickle, 2004)、cMeso-1の下流ではないようである。つまり、分節境界形成においてTbx18はcMeso-1とは別経路で働いていると思われる。けれども、本研究におけるephrinB2のreverse signalingが分節境界を誘導するのに必要であるという結果から考えて、Tbx18の下流でEphA4以外にレベル-1付近で発現している Eph (Baker and Antin, 2003; Flenniken et al., 1996; Soans et al.,

1996) が働いており、最終的には ephrinB2 の reverse signaling を活性化している可能性がある。

また、cMeso-1 は EphA4 以外に PAPC, Pax2 及び Sox9 の発現を誘導した。マウス胚、カエル胚やゼブラフィッシュ胚においても cMeso-1/Mesp が PAPC の発現を誘導することが解っている (Kim et al., 2000; Rhee et al., 2003; Sawada et al., 2000)。しかしながら、本研究から PAPC, Pax2 及び Sox9 はセグメンター活性と直接は関わっていないことが示された (図10)。おそらく別の役割があると考えられる。例えば、cMeso-1 は Pax2 を介して NCAM の発現を誘導し、体節構成細胞同士の接着を制御していることが本研究から示唆された。この NCAM は単に細胞接着を制御しているだけでなく、細胞間における受容体とリガンドの安定した結合を促し、間接的に Eph/ephrin signaling や Notch signaling などを補助しているのかもしれない。

PAPC も細胞接着 (Obata et al., 1995) だけでなく、細胞極性を制御する Wnt signaling の PCP pathway にも関わっており (Medina et al., 2004; Unterseher et al., 2004)、前述したレベル-1 付近における個々の細胞の細胞膜上での ephrinB2 の後方の局在を制御することによって Eph/ephrin signaling を補助していることが期待される。すでに PAPC の細胞外ドメインの過剰発現による分節化の異常が報告されているが (Kim et al., 1998; Rhee et al., 2003; Yamamoto et al., 1998)、この影響が PAPC の接着因子としての機能を阻害したために起こったことなのか、Wnt signaling の PCP pathway における機能を反映していることなのかは、はっきりしていない。今後の解析により、Wnt signaling や Eph/ephrin signaling との関わりを含めた、分節境界形成における PAPC の役割の詳細が明らかになるかもしれない。

また、Sox9 は、脊椎動物の軟骨形成において type II collagen の発現を誘導することが知られており (Bell et al., 1997; Bi et al., 1999; Genzer and Bridgewater, 2007; Healy et al., 1999; Kulyk et al., 2000; Lefebvre et al., 1997)、fibronectin (Danker et al., 1992; Koshida et al., 2005) のように collagen も境界の隙間に入り込み、分節境界維持に関わっていることが推測される。

## 最後に

本研究を通して、未分節中胚葉における分節境界形成の分子メカニズムの全体像が見えてきた (図15)。レベル-1 後方において特異的に発現する cMeso-1 は、EphA4 の発現を誘導する。そして EphA4 によりレベル-1 前方の細胞で

ephrinB2 reverse signalingが活性化される。このephrinB2 reverse signaling 活性こそがセグメンター活性の分子実体であり、このシグナルが細胞間反発や間充織-上皮転換を促すことによって分節境界が形成されると考えられる。Eph/ephrin signalingによって起こるであろう細胞間反発作用や間充織-上皮転換は、境界を作る上での非常に理にかなった細胞挙動であり、体づくりの様々な局面において、組織の区分けをするために類似した分子メカニズムが働いている可能性が高い (Blair, 2004; Dahmann and Basler, 1999; Irvine and Rauskolb, 2001; McNeill, 2000; Takahashi, 2005; Tepass et al., 2002)。

また、Eph/ephrin による細胞間反発作用や間充織-上皮転換以外にも、接着因子による細胞凝集など、未分節中胚葉の分節化はたくさんの分子が関わる複数の現象が合わさっており、一見、複雑で難解のように思われる。しかし、今回のように Tet-on system とニワトリ胚操作を組み合わせ、局所的に遺伝子操作を行うことにより、それぞれの現象を分けて単純化して捉えることができる。今後も生体内における工夫を凝らした解析により、未分節中胚葉の分節化に限らず、体づくりにおける細胞挙動の普遍原理に迫っていきたい。

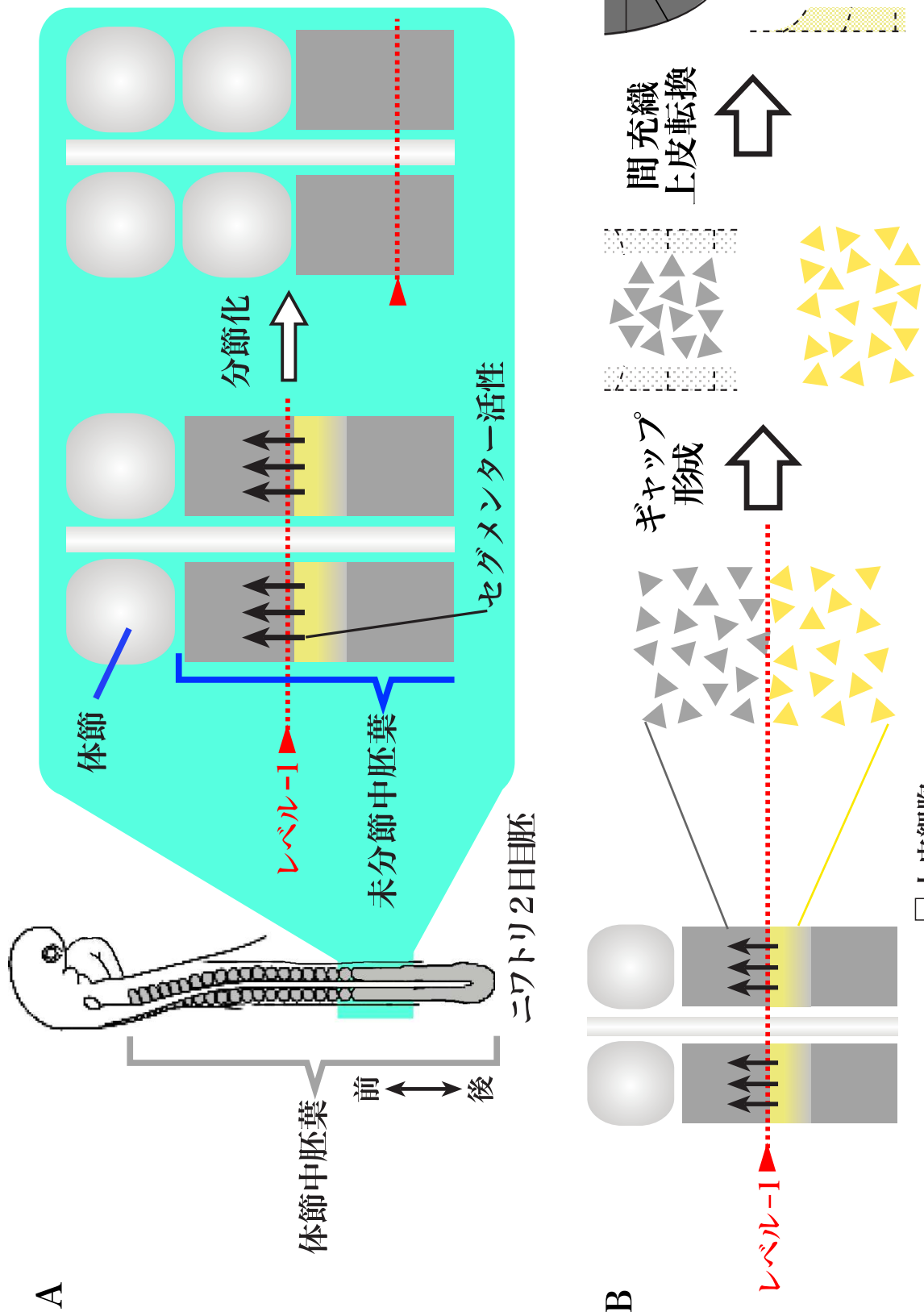


図1 ニワトリの体節形成における未分節中胚葉の分節化

(A) ニワトリの2日目胚 (Stage 14) を背側からみた模式図。体節は、前後軸に沿ってひとつづきのPSMが前側から90分周期で分節化されることにより、1対ずつ形成される。レベル-1とは次に分節化する予定境界のことである。レベル-1のすぐ後方に位置する細胞群(黄色)が分節境界の誘導活性(セグメンター活性)を有する。このレベル-1後方の細胞が前方の細胞へ働きかけることによって分節化が起こる。(B) レベル-1付近の細胞レベルでの模式図。まず、レベル-1において均一に配置していた間充細胞群の間にギャップが形成される。次に、境界に沿った前側一列の細胞が上皮化し、明確な分節境界ができあがる。

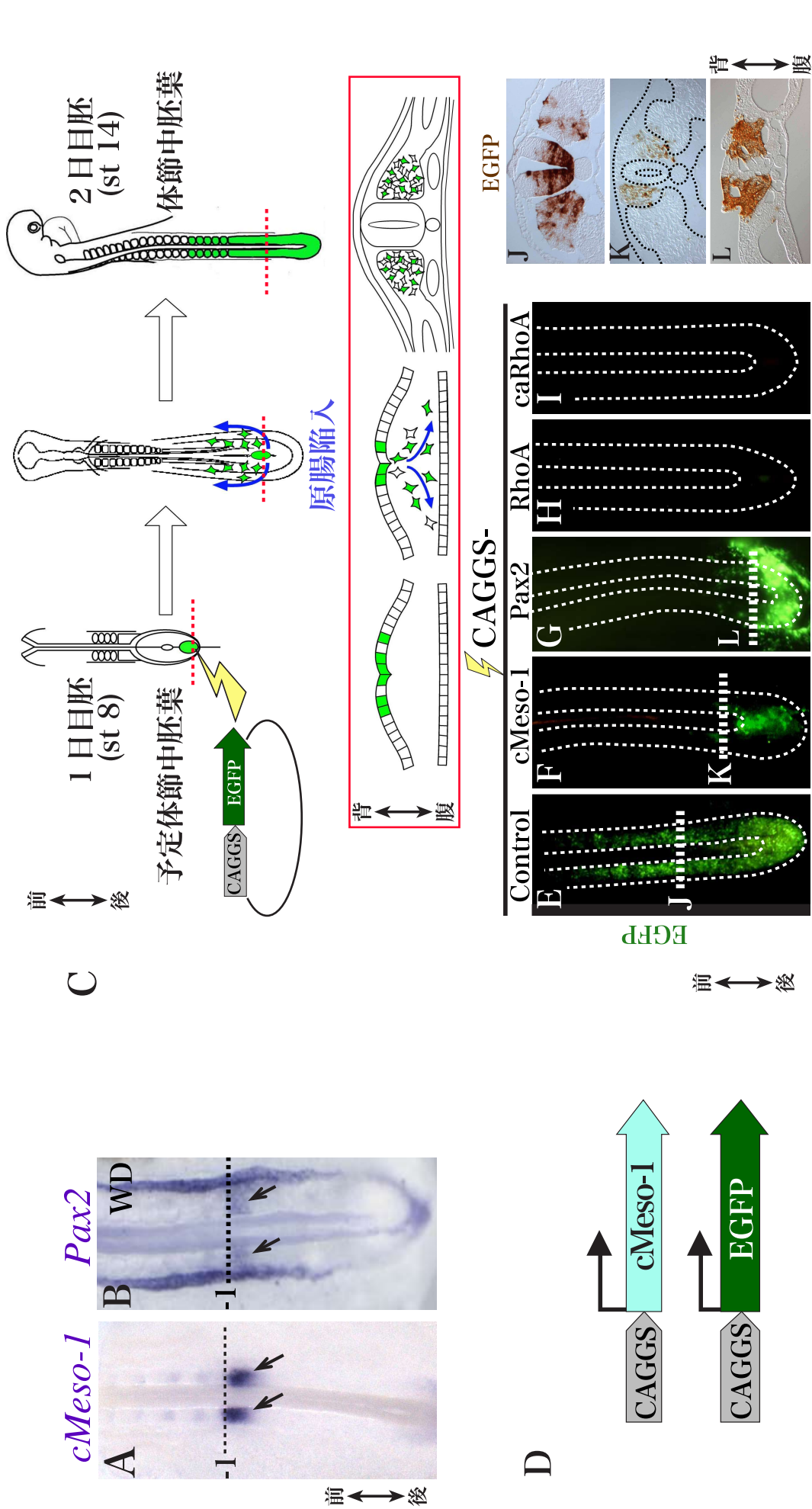


図2 Meso-1、Pax2 及び活性型 RhoA は予定体節中胚葉細胞の原腸陥入を阻害した *cMeso-1* (A) と *Pax2* (B) の体節中胚葉周辺における本来の発現部位を *in situ* hybridization によって検出した。レベル -1 後方 (矢頭) と tailbud にシグナルが見られる。また、Pax 2 の場合、Wolffian duct (WD) にもシグナルが見られる。(C) *In ovo* electroporation により、体節中胚葉へ EGFP を導入する過程の模式図。ニワトリ 1 日目胚 (Stage 8) の予定体節中胚葉領域に pCAGGS-EGFP 遺伝子を導入した。このとき予定体節中胚葉は上皮様である。発生が進むにつれて体腔内に潜り込み、移動・増殖し、体節中胚葉を形作る。(D) electroporation により、共導入したプラスミド DNA の模式図。(E) Control pCAGGS と pCAGGS-EGFP を導入した体節中胚葉の EGFP 像。体節中胚葉において均一に EGFP 蛍光が観察された。しかしながら、pCAGGS-EGFP と共に pCAGGS-cMeso-1 (F) もしくは pCAGGS-Pax2 (G) を導入した細胞は tailbud に溜まっている。pCAGGS-EGFP と共に pCAGGS-RhoA (H) もしくは pCAGGS-caRhoA (I) を導入した場合、EGFP 陽性細胞は全くも見当たらなかった。(J, K, L) E,F,G の横断面の組織切片。抗 GFP 抗体で抗体染色した (茶色)。Control (J) の場合は、PSM の腹側まで均一にシグナルが見られるのに対し、pCAGGS-cMeso-1 (K) もしくは pCAGGS-Pax2 (L) を導入した EGFP 陽性細胞は正常に原腸陥入できずに背側に溜まっている。



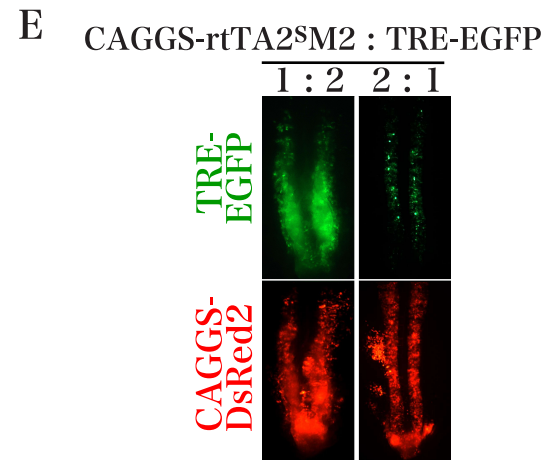
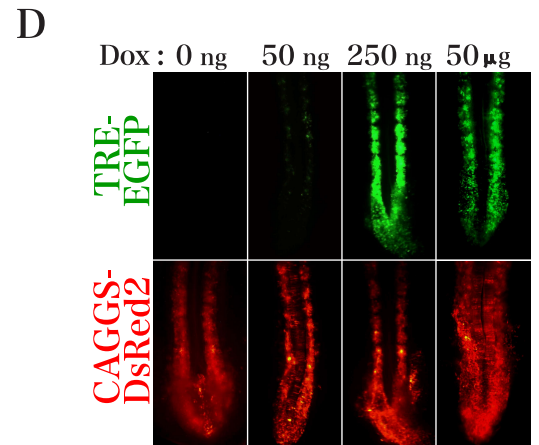
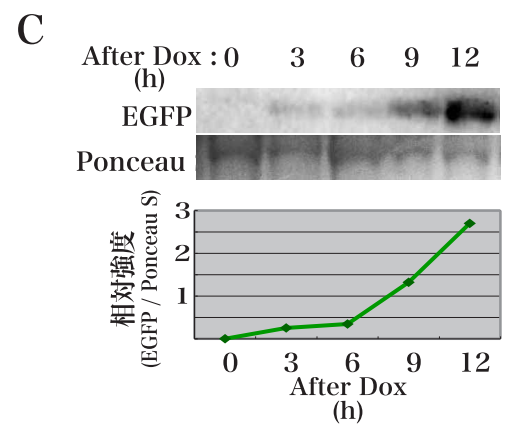
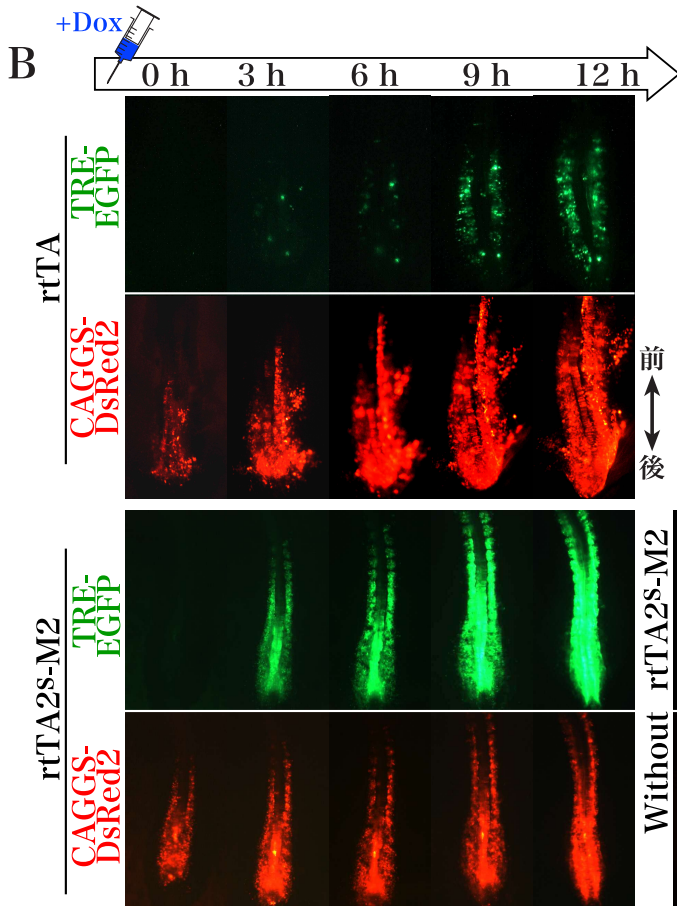
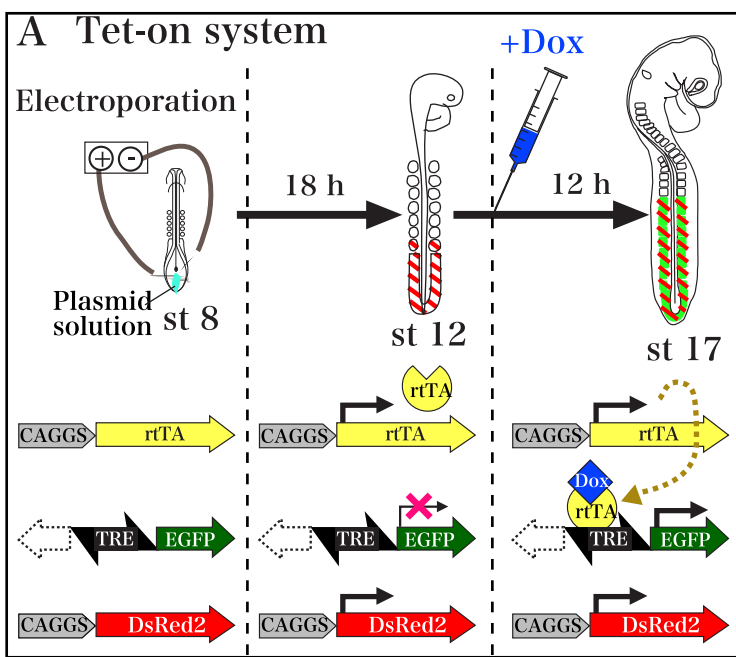


図3 ニワトリ胚において遺伝子の発現を誘導するシステム (Tet-on system) を確立した (A) Tet on system により体節中胚葉で EGFP を発現誘導する過程の模式図。 *In ovo* electroporation により、3 種類のプラスミド (pTRE-EGFP、pCAGGS-rtTA 及び pCAGGS-DsRed2) を Stage 8 において予定体節中胚葉領域に導入した。プラスミドが導入されたあと、すぐに rtTA (黄色) と DsRed2 (赤色) が CAGGS プロモーターによって転写される。Dox (青色) を卵に注射することで、rtTA は cis element である TRE (黒色) に結合できるようになる。TRE は、その両脇に位置する 2 つの遺伝子を同時に転写できるように設計されている (点線矢印のところに cMeso-1 などの目的遺伝子を挿入した)。 (B, D, E) の各パネルの上下は同時期の同一個体。 (B 上のパネル) EGFP 蛍光は Dox 注射直後ほとんど観察されなかったが、3 時間経過して顕著に EGFP 蛍光が認められた。 (B 下のパネル) rtTA の改良型 (rtTA<sup>2s</sup>-M2) を用いて B 上のパネルと同じ実験を行った結果、Dox を投与しない状態での EGFP 蛍光が完全に見られなくなった。 (C) Western blotting により、Dox 投与後の異なる時間経過における EGFP の発現量を比べた。 (D) 異なる Dox 投与量での EGFP 蛍光強度を比べた。250ng 投与したとき、50 μg のときと同程度の強い EGFP 蛍光が観察された。 (E) pCAGGS-rtTA<sup>2s</sup>-M2 と pCAGGS-DsRed2 の割合を変えて比べたところ、2:1 より 1:2 のほうが強い EGFP 蛍光が認められた。



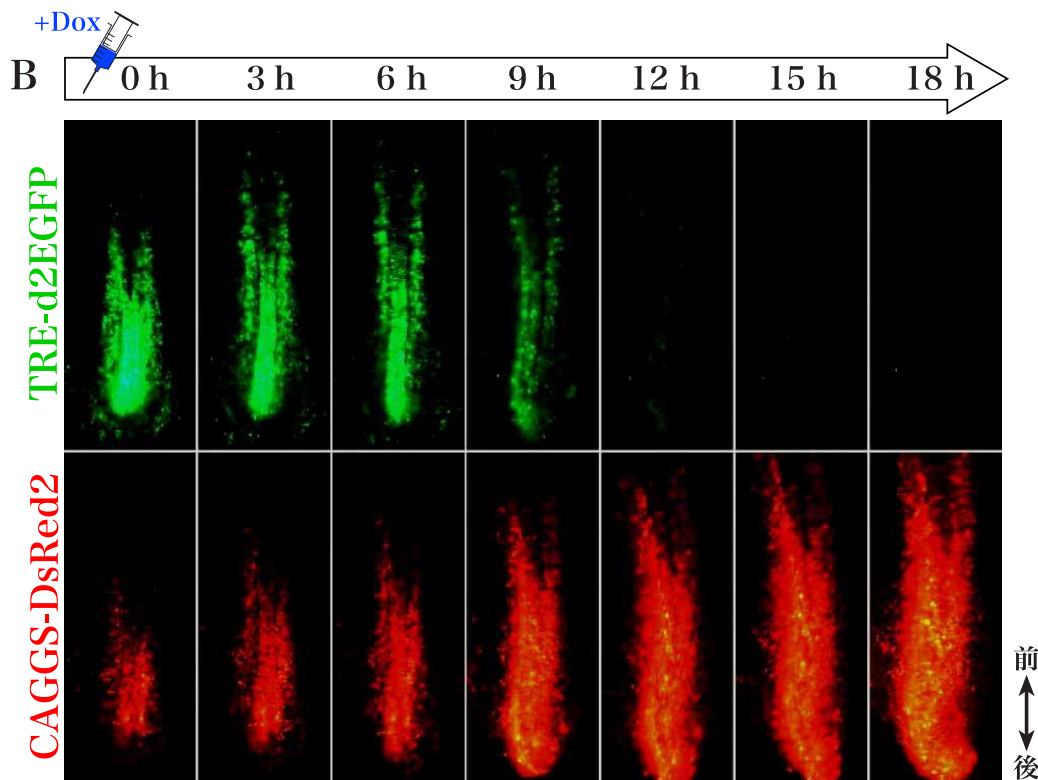
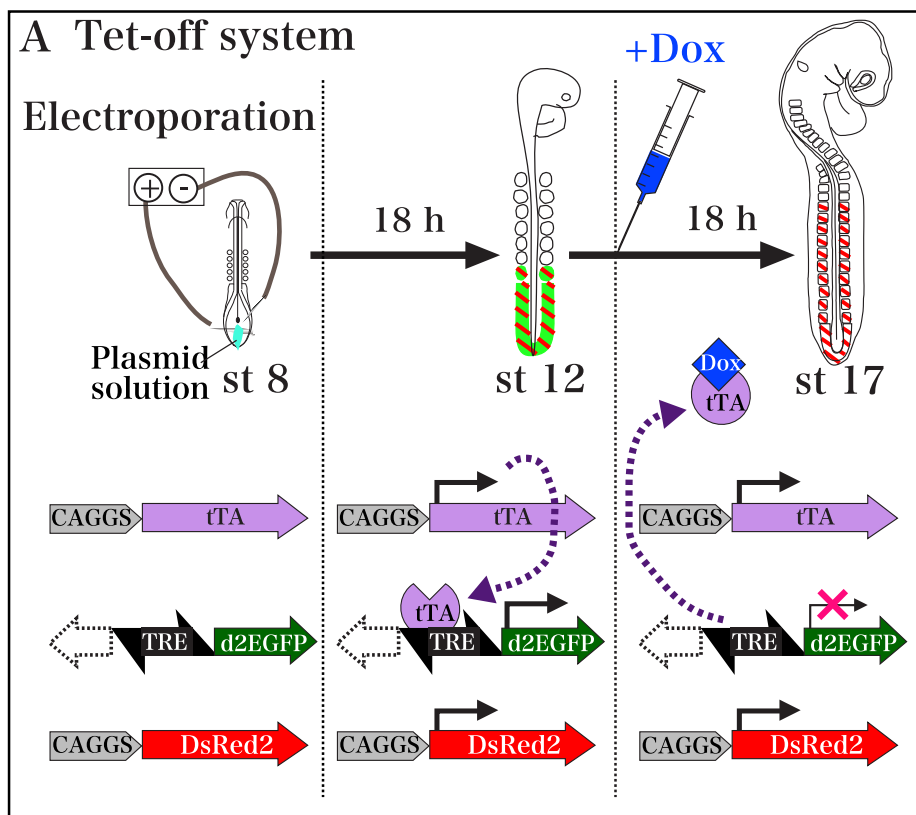


図4 ニワトリ胚において遺伝子の発現を停止するシステム (Tet-off system) を確立した

(A) Tet-off system により体節中胚葉において EGFP を発現停止する過程の模式図。図1 A の pTRE-EGFP の EGFP が d2EGFP に、pCAGGS-rtTA の rtTA が tTA に置き換わっている。Dox が投与されると、転写活性化因子 tTA が TRE からはずれ、d2EGFP の発現が止まる。(B) パネルの上下は同時期の同一個体。Dox 注射後 9 時間で d2EGFP の蛍光が弱くなり始め、15 時間経過すると d2EGFP の蛍光は完全に消失した。

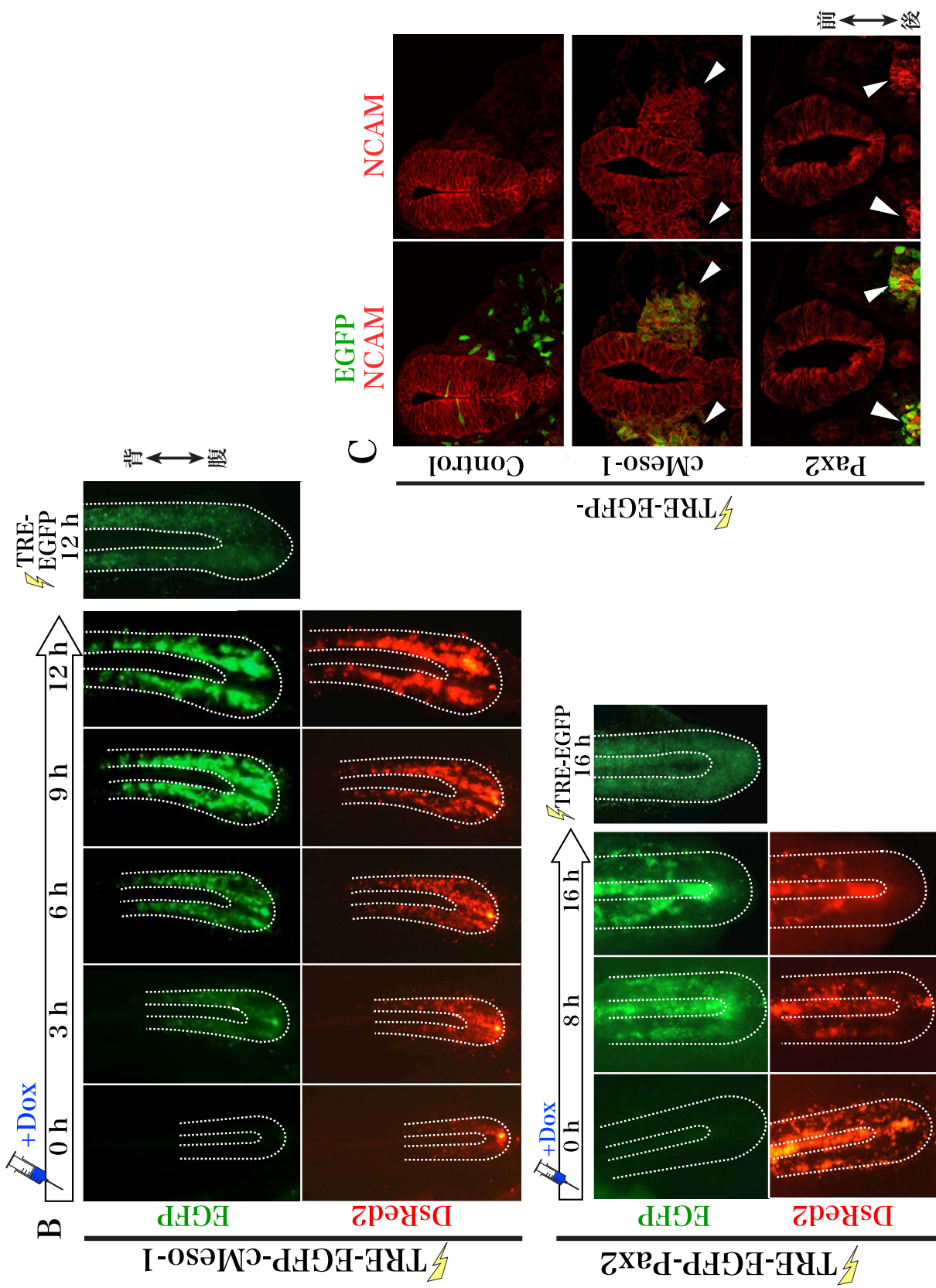


図5 cMeso-1 や Pax2 は体節中胚葉において NCAM の発現を誘導し、細胞凝集を引き起した (A) B の実験に用いた Tet-on system プラスミドの模式図。(B) 各パネルの上下は同時期の同一胚。(B 上のパネル) cMeso-1 を Tet-on system で体節中胚葉に強制発現させた場合、Dox 投与後 3 時間では EGFP 蛍光が体節中胚葉全体に均一に観察された。6 時間経過すると、徐々に EGFP 陽性細胞同士で凝集し始めた。(B のパネル) Pax2 の場合も、Dox が投与して 8 時間後には EGFP 蛍光が体節中胚葉全体に均一に観察された。16 時間経過すると、EGFP 陽性細胞同士で凝集塊をつくっていた。(C) 左右は同一個体。cMeso-1 や Pax2 を強制発現させた未分節中胚葉の横断切片において、Control EGFP の抗体染色をした。cMeso-1 や Pax2 の強制発現細胞において異所的な NCAM の蓄積 (白矢頭) が見られたに對して、Control EGFP の場合には、このような蓄積は認められなかった。(Pax2 に関するデータは末次里奈子氏より供与された)

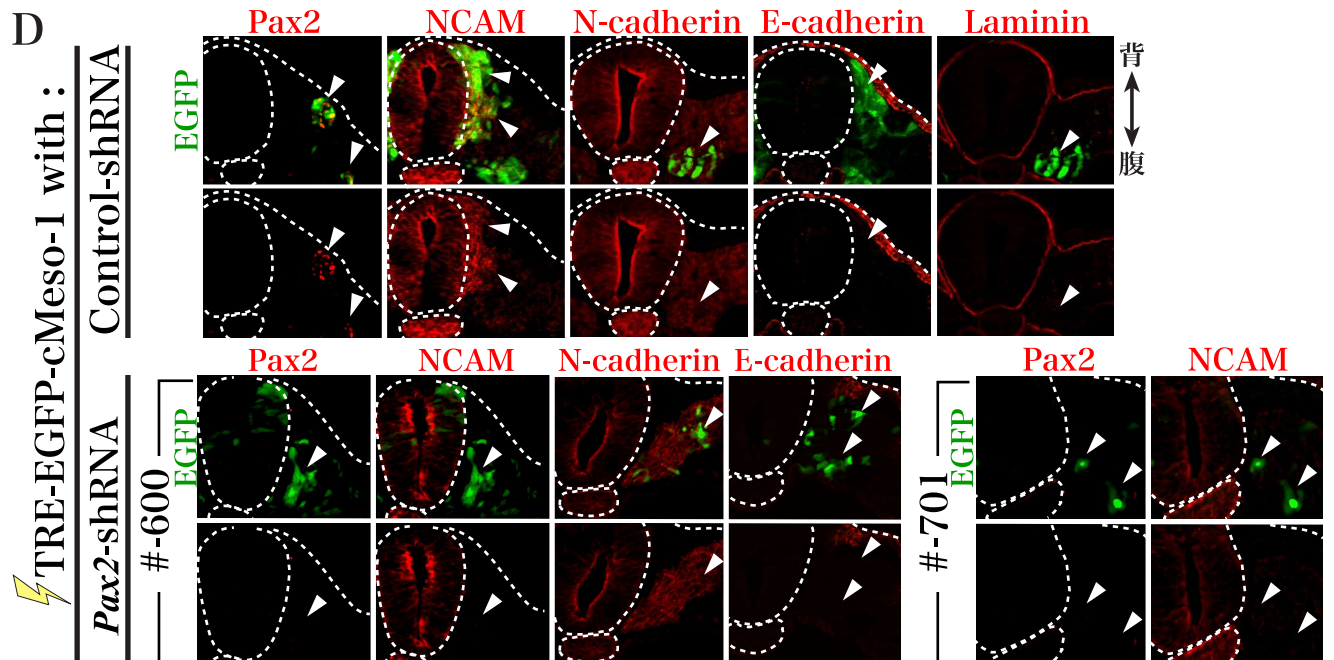
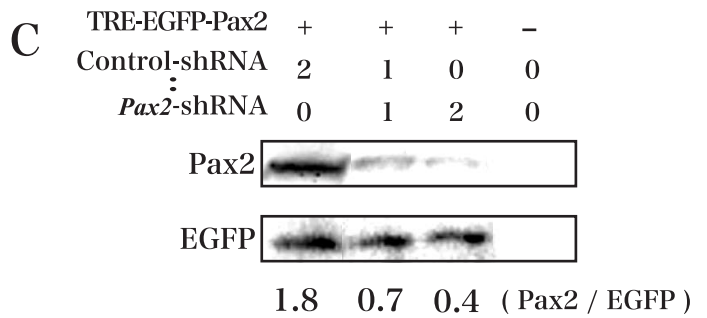
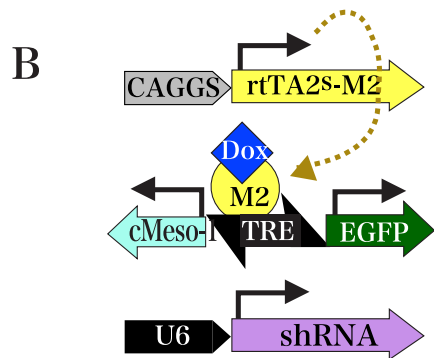
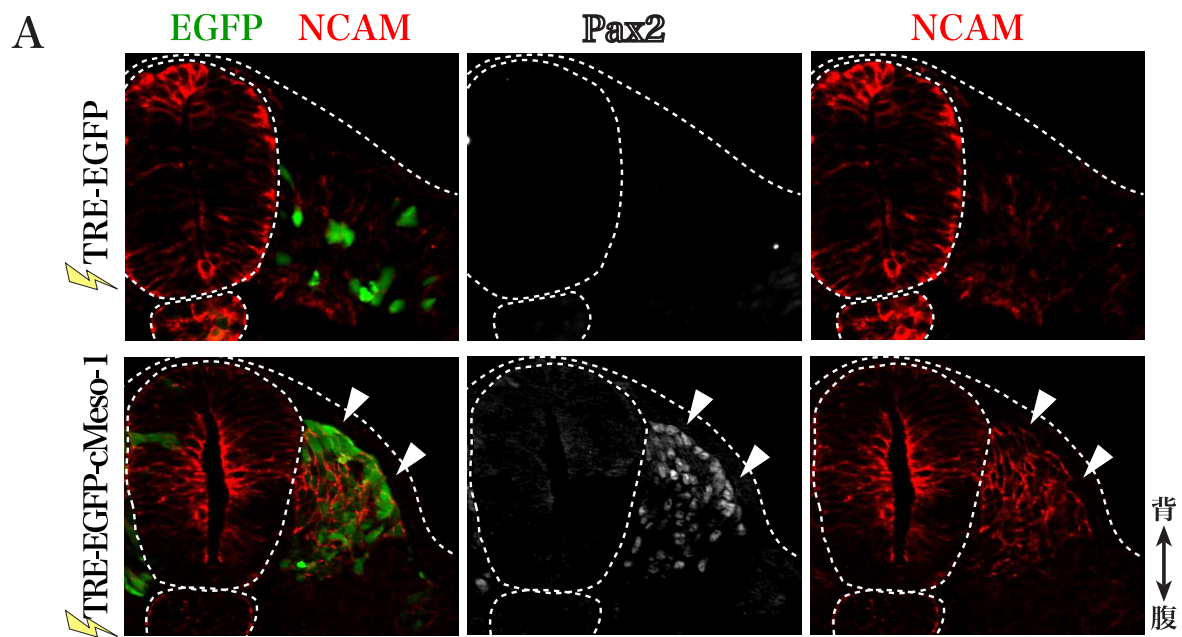


図6 cMeso-1 による NCAM の誘導には、Pax2 が必要である

(A) 図 4A の実験と同様に cMeso-1 を強制発現させた未分節中胚葉の横断切片において、Pax2 及び NCAM の抗体染色を行った。横列は同一個体。cMeso-1 導入細胞において異所的な Pax2 と NCAM の蓄積が見られるのに対して、Control GFP の場合には、このような蓄積は認められなかった。(B) C と D の実験において、共導入した Tet-on system 用と RNAi 用のプラスミドについての模式図。(C) shRNA により Pax2 の発現を特異的に阻害できることを Western blotting を用いて確認した。写真の下に Pax2 量 / EGFP 量の数値を示している。(D) cMeso-1 と Pax2-shRNA を強制発現させた未分節中胚葉の横断切片において Pax2, NCAM, N-cadherin, E-cadherin 及び laminin の抗体染色を行った。各パネルの上下は同一個体。cMeso-1 と Control shRNA を強制発現させた細胞では、異所的な Pax2 と NCAM の蓄積が見られるのに対して (D 上のパネル白矢頭)、cMeso-1 と Pax2-shRNA を強制発現させた場合には、Pax2 の発現がないことが確認され、さらに異所的な NCAM の蓄積も認められなかった (D 下のパネル白矢頭)。これらの実験において、N-cadherin, E-cadherin 及び laminin の発現に全く影響は見られなかった。



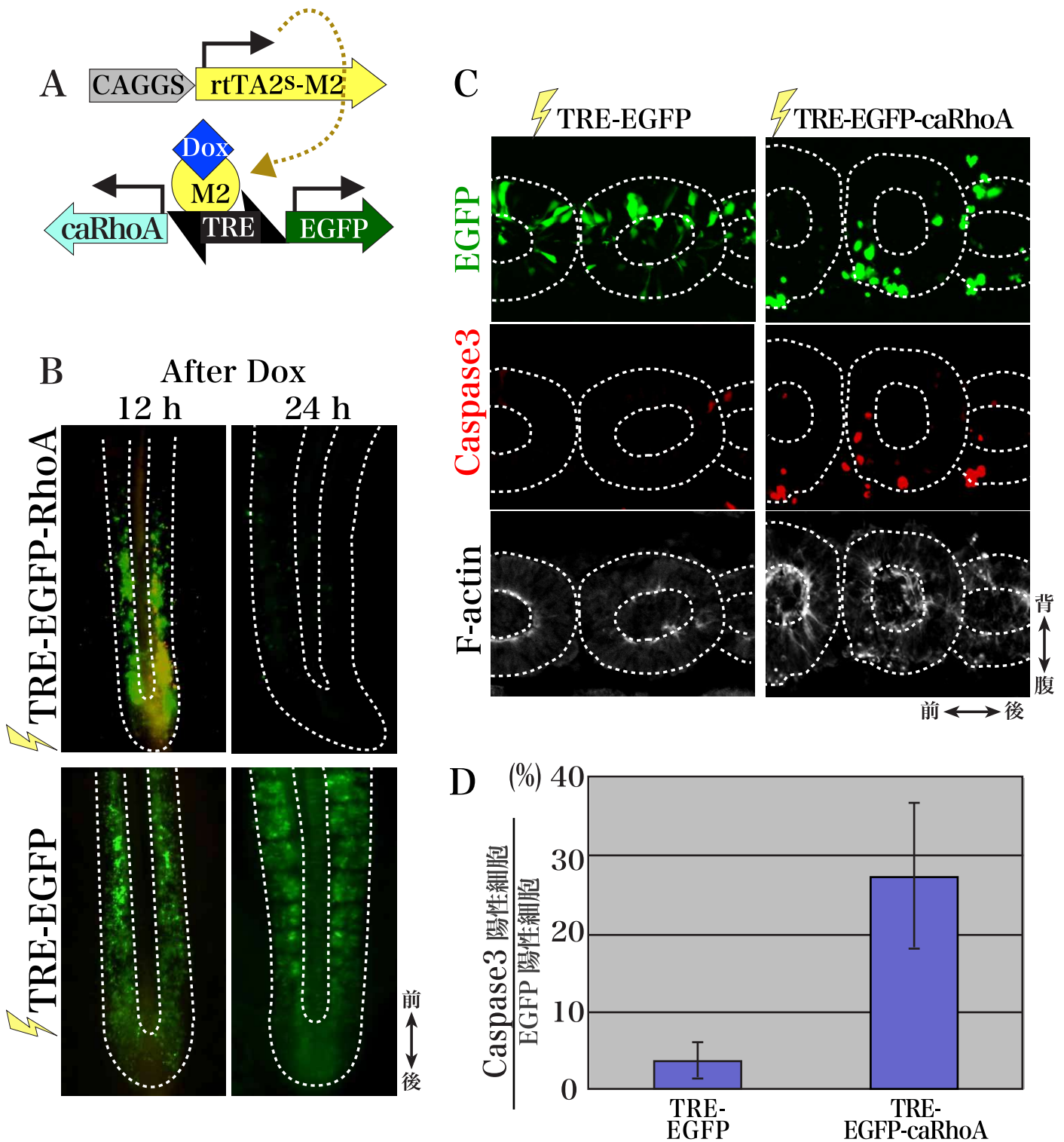
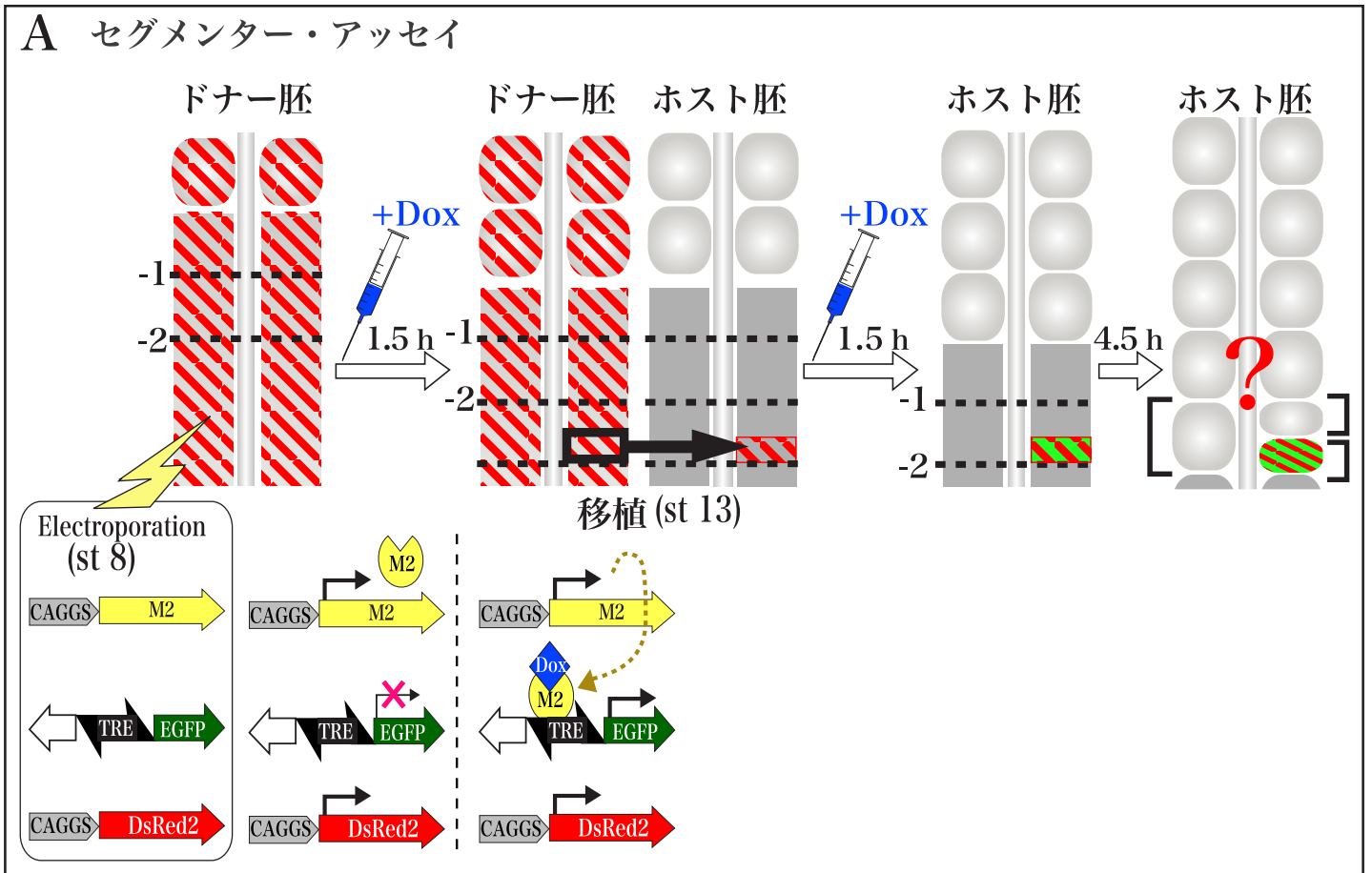


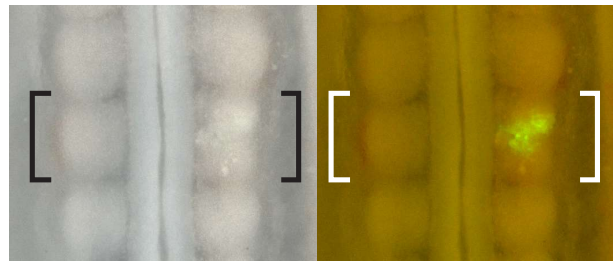
図7 RhoA の活性は体節中胚葉において細胞死を引き起こした

(A) B-D の実験に用いた Tet-on system プラスミドの模式図。(B) A のプラスミドを導入して 18 時間インキュベートを行い、Dox 投与から 12 時間後には EGFP 蛍光が体節中胚葉において均一に観察された。しかし、24 時間後に EGFP 蛍光は、ほとんど消失していた。これに対して control TRE-EGFP の場合では、24 時間後も EGFP 蛍光は体節中胚葉において均一に観察された。(C) Dox 投与から 12 時間後の caRhoA を強制発現させた体節中胚葉の縦断切片において、active-Caspase 抗体染色によって Apoptosis 細胞の検出を行った。縦列は同一胚。(D) C の実験における EGFP 陽性細胞中の active-Caspase3 陽性細胞の割合をグラフ化した。(データの一部は仲矢由紀子博士より供与された)

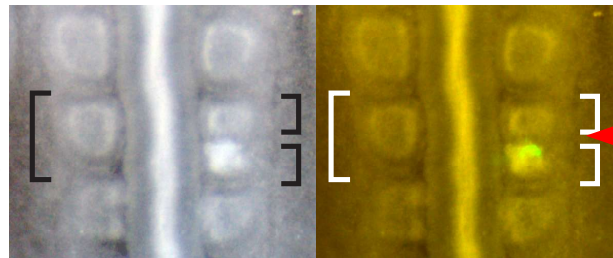


**B**

**EGFP  
(Control)**



**cMeso-1**



**Pax2**

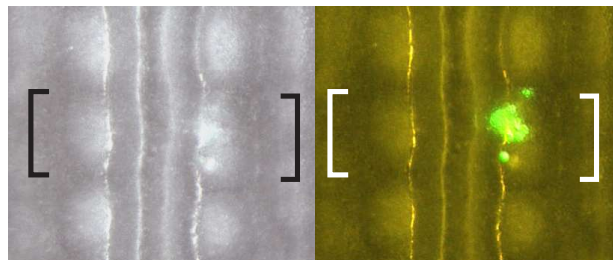


図 8 cMeso1 発現細胞はセグメンター活性を示した

(A) Tet-on system を組み込んだセグメンター・アッセイの模式図。最初に、*in ovo* electroporation によって予定体節中胚葉領域へ pTRE-EGFP-cMeso-1、pCAGGS-rtTA2<sup>s</sup>-M2 及び pCAGGS-DsRed2 を共導入する。次に遺伝子を導入された組織の一部を切り取り、遺伝子を導入されていない別の胚の本来分節しない部位へこの組織片を移植する。その後 Dox を投与することによって遺伝子の発現が誘導され、異所的な遺伝子の発現境界ができあがる。なお、発現を誘導した遺伝子が機能するまでのタイムラグを考慮して、移植する 1.5 時間前のドナー胚においても、Dox 溶液を注射した。(B) cMeso-1 や Pax2 を用いてセグメンター・アッセイを行った。各パネルの左右は同一個体 (左; 明視野像, 右; EGFP 蛍光像)。cMeso-1 の発現境界に沿って異所的な分節境界が形成された (赤矢頭)。これに対して EGFP のみや Pax2 の場合では、そのような影響は全くなかった。

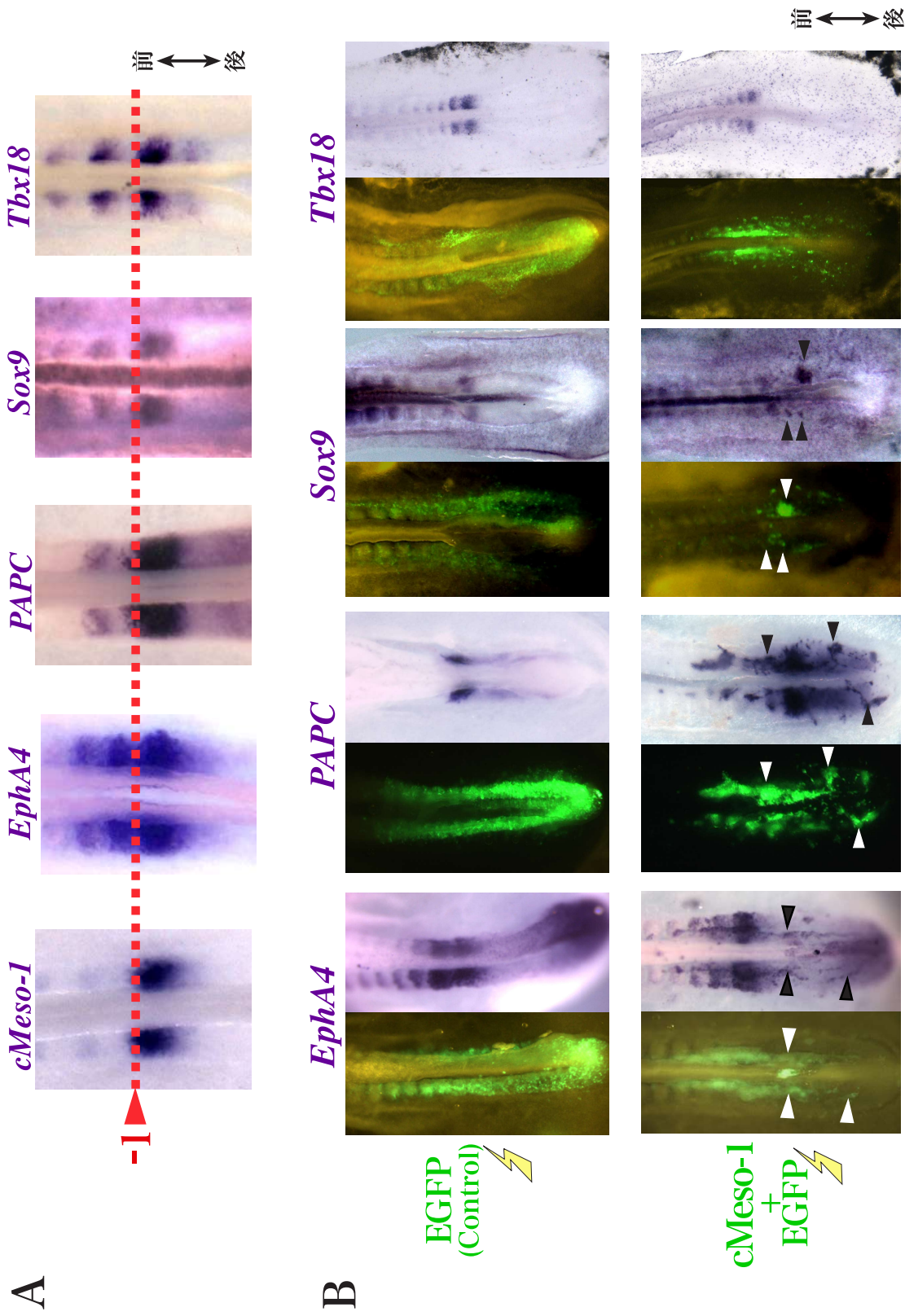


図9 cMeso1 は *EphA4*, *PAPC* 及び *Sox9* の発現を誘導した (A) *cMeso-1*, *EphA4*, *PAPC*, *Sox9* 及び *Tbx18* のレベル -1 付近における本来の発現部位を *in situ* hybridization によって比べた。 *EphA4*, *PAPC*, *Sox9* 及び *Tbx18* は、*cMeso-1* と同様にレベル -1 後方において特異的に発現している。(B) *cMeso-1* と EGFP を未分節中胚葉において共発現させ、*EphA4*, *PAPC*, *Sox9* 及び *Tbx18* の発現が異所的に誘導されるのかを *in situ* hybridization を用いて調べた。各パネルの左右は同一個体 (左; EGFP 蛍光像, 右; *in situ* hybridization 像)。 *cMeso-1* を強制発現させた細胞 (横二列目の各パネル左写真の白矢頭) において異所的に *EphA4*, *PAPC*, *Pax2* 及び *Sox9* の発現が誘導された (横二列目の各パネル右写真の黒矢頭)。Control EGFP の場合には、このように影響は見られなかった (横一列目の各パネル)。(データの一部は佐藤有紀博士と末次里奈子氏より提供された)



## セグメンター・アッセイ

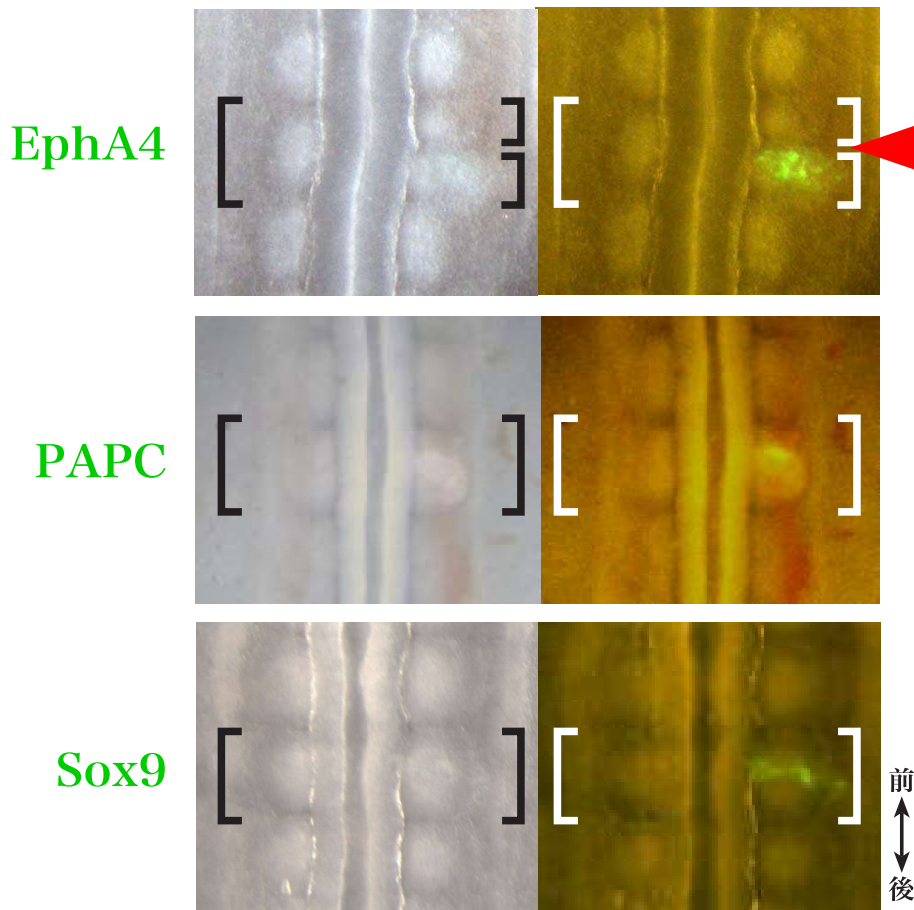
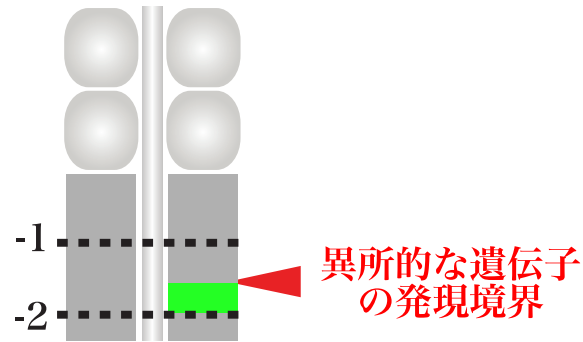


図 10 EphA4 発現細胞はセグメンター活性を示した  
EphA4, P<sub>APC</sub> 及び Sox9 をそれぞれ用いてセグメンター・アッセイを行った。各パネルの左右は同一個体 (左; 明視野像, 右; EGFP 蛍光像)。これら 3 つの遺伝子の中で EphA4 の場合にだけ、発現境界に沿って異所的な分節境界が形成された (赤矢頭)。

セグメンター・アッセイ

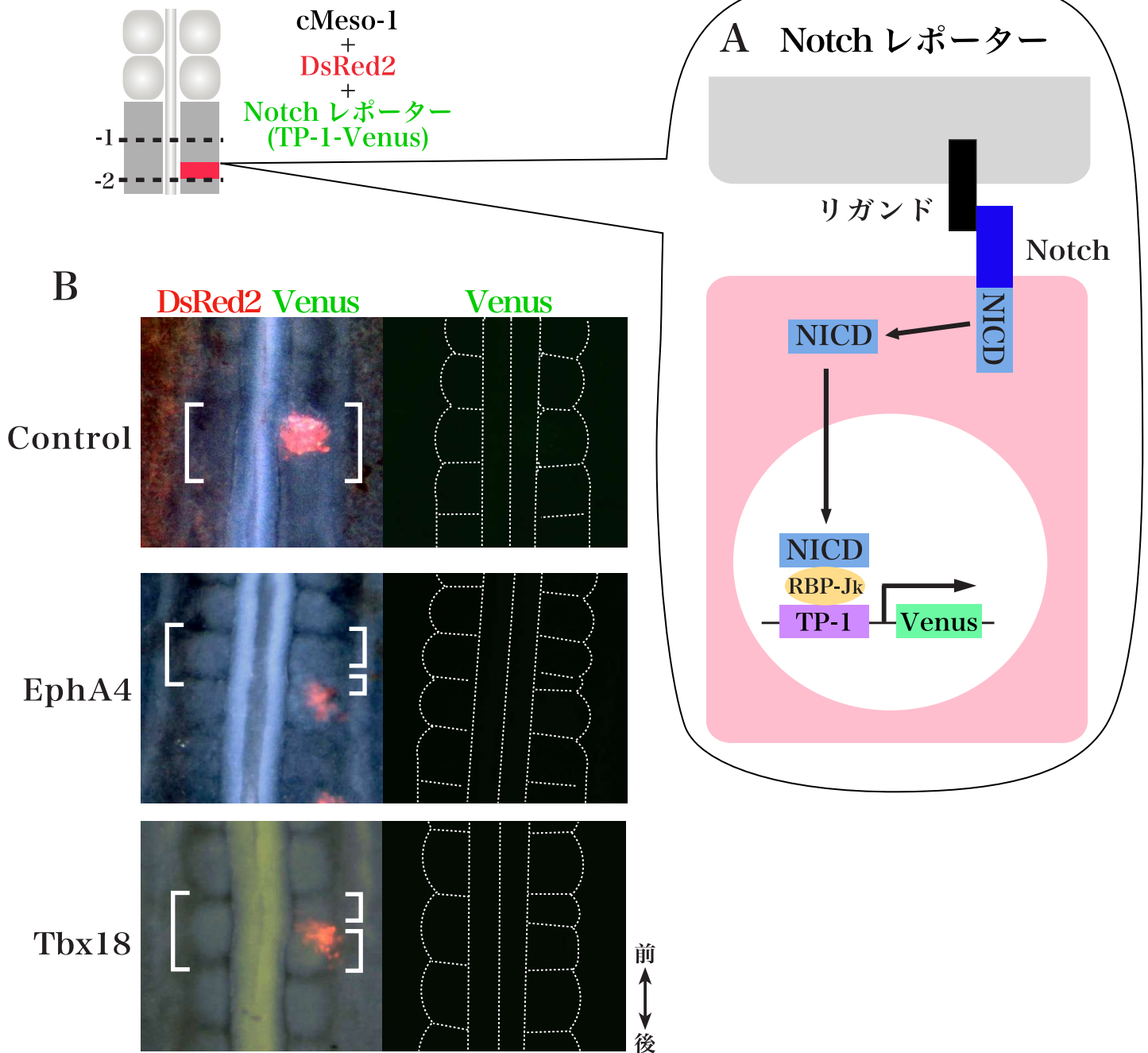


図 11 EphA4 は体節中胚葉において Notch を活性化しない

(A) Notch レポーターの作用機序の模式図。レポーター遺伝子 Venus の転写は、NICD (Notch intracellular domain) と RBP-J  $\kappa$  の複合体が、TP-1 プロモーター (12  $\times$  RBP-J  $\kappa$  結合配列を含む) へ結合することによって活性化する。(B) EphA4 及び Tbx18 によってセグメンター活性を引き起こしたときに、Notch レポーターの活性を調べた。そのために、これらの遺伝子、Notch レポーター及び pCAGGS-DsRed2 を共導入して、セグメンター・アッセイを行った。各パネルの左右は同一個体 (右; 明視野像, DsRed2 蛍光像と Venus 蛍光像の重合, 左; Venus 蛍光像) Venus (緑色) 発現細胞 = Notch 活性化細胞。DsRed2 (赤色) 発現細胞 = electroporation をされた細胞。EphA4 及び Tbx18 それぞれの発現境界に沿って異所的に分節境界が誘導された (各パネル左)。このとき、EphA4 及び Tbx18 を強制発現させた細胞において、Notch レポーターの活性は見られなかった (パネル右白矢印)。



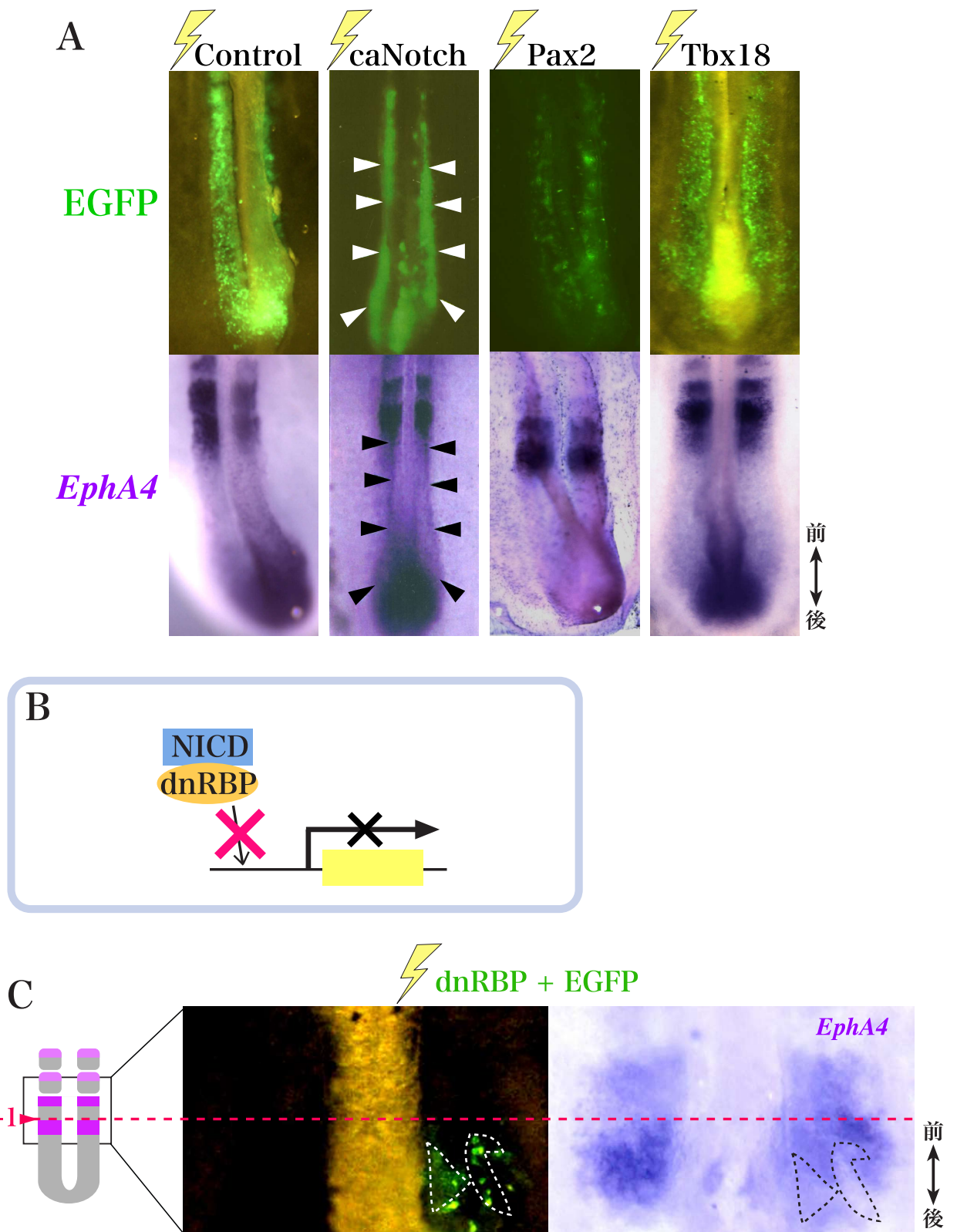


図 12 PSM において Notch signaling は *EphA4* の発現を誘導するのに必要十分である (A) *caNotch*, *Tbx18* や *Pax2* をそれぞれ未分節中胚葉において強制発現させ、*EphA4* の発現を *in situ* hybridization によって調べた。各パネルの上下は同一個体 (上; EGFP 像。下; *in situ* hybridization 像)。caNotch を強制発現させた細胞 (パネル上の白矢頭) においてのみ、異所的に *EphA4* のシグナル (パネル下の黒矢頭) が観察された。(B) dnRBP の作用機序の模式図。dnRBP は内在的な RBP-J  $\kappa$  と競合して NICD と複合体をつくるが、DNA 上の本来の RBP-J  $\kappa$  ターゲット配列に結合できないため、Notch signaling を阻害する。(C) dnRBP と EGFP を未分節中胚葉において共発現させ、*EphA4* の発現を調べた。パネルの左右は同一胚 (左; EGFP 像。右; *EphA4* の *in situ* hybridization 像)。dnRBP を強制発現させていない細胞と比べて、dnRBP を強制発現させた細胞 (パネル左の白点線枠内) における内在的な *EphA4* の発現が有意に減少していた (パネル右の黒点線枠内)。

### セグメンター・アッセイ

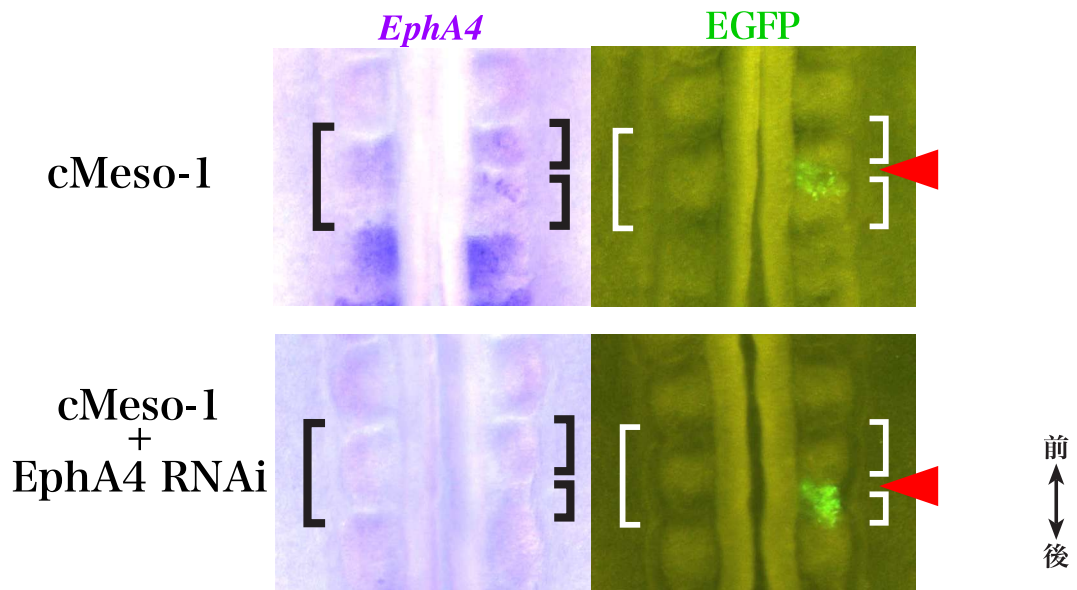
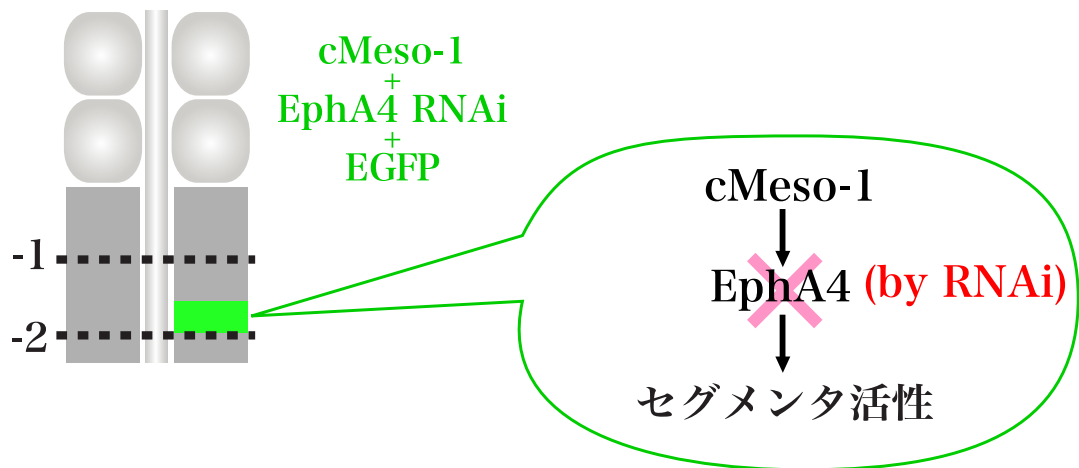


図 13 cMeso-1 が分節境界を誘導するのに、EphA4 以外の細胞間シグナル伝達因子が存在する可能性がある

cMeso-1 が分節境界を誘導するのに EphA4 が必要なのかを調べるために、cMeso-1 と EGFP を共導入した細胞において RNAi により EphA4 の発現を阻害し、セグメンター・アッセイを行った。各パネルの左右は同一胚 (左; *EphA4* の *in situ* hybridization 像。右; EGFP 蛍光像)。cMeso-1 の強制発現と EphA4 の RNAi を行った細胞において、*EphA4* の発現は観察されないが、その細胞に沿って異所的な分節境界が形成された (下のパネル右, 赤矢頭)。

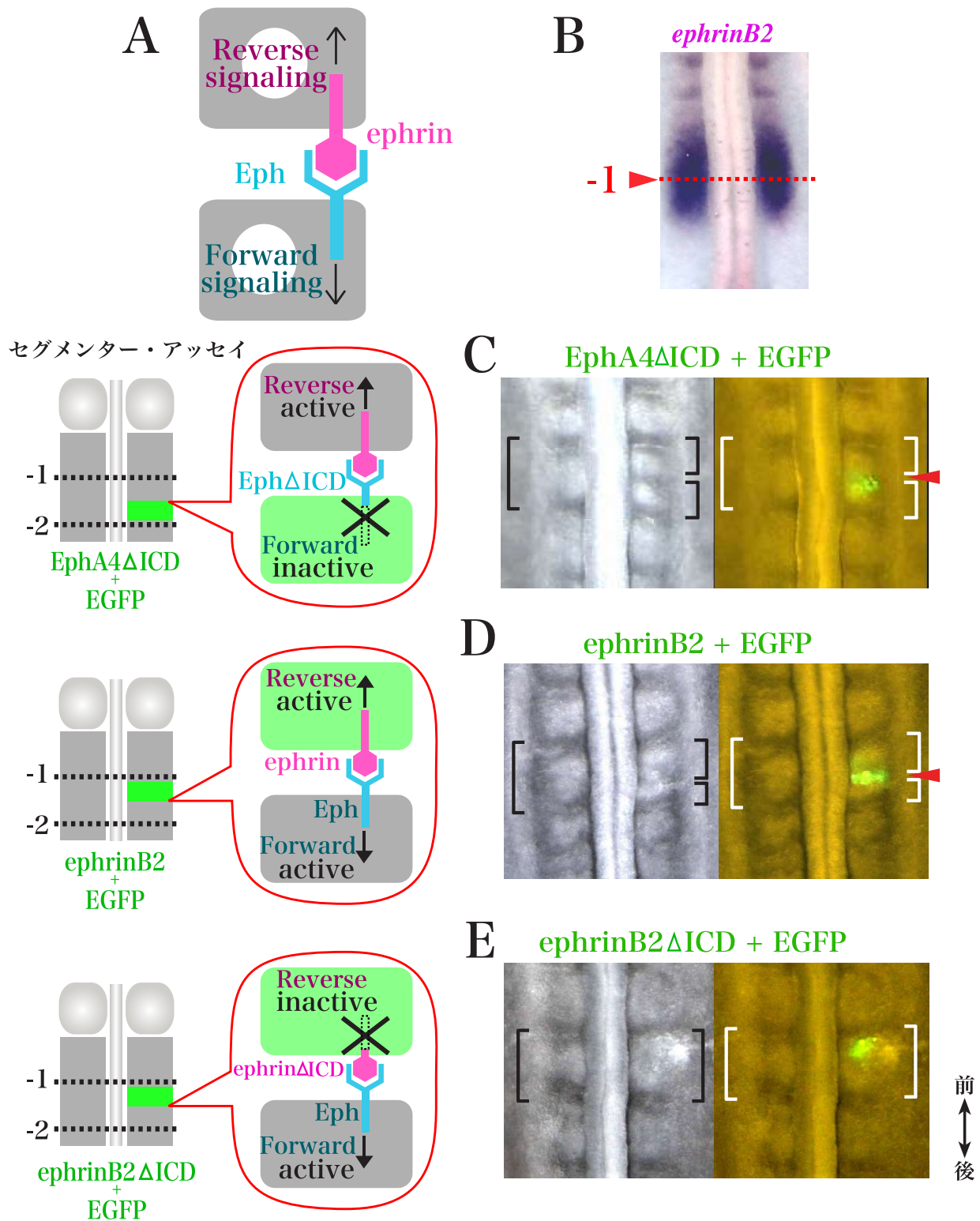


図 14 分節境界誘導に ephrin reverse signaling は必要十分である

(A) Eph/ephrin signaling は一定の条件下で双方向性がある (Eph forward signaling, ephrin reverse signaling)。 (B) ニワトリ胚の PSM 前方における *ephrinB2* の発現 (*in situ* hybridization 像) (C) 細胞内 domain を欠損させた EphA4、EphA4 Δ ICD を用いてセグメンター・アッセイを行った。この EphA4 Δ ICD は、発現させた細胞の EphA4 forward signaling に対しては不活性だが、隣りの細胞の ephrinB2 reverse signaling に対しては活性がある。この EphA4 Δ ICD を用いてセグメンター・アッセイを行った結果、EphA4 Δ ICD の上側発現境界に沿って、異所的な発現境界が形成された (赤矢頭)。(D) ephrinB2 の全長を用いて、セグメンター・アッセイを行った。ephrinB2 の下側発現境界に沿って、異所的な発現境界が形成された (赤矢頭)。(E) 細胞内 domain が欠損型 ephrinB2、ephrinB2 Δ ICD を用いてセグメンター・アッセイを行った。この ephrinB2 Δ ICD は、発現させた細胞の ephrinB2 reverse signaling のに対しては不活性だが、隣りの細胞の EphA4 forward signaling に対しては活性がある。この ephrinB2 Δ ICD を用いてセグメンター・アッセイを行った結果、何の影響も見られなかった。パネル C-E において左右は同一個体 (左; 明視野像, 右; EGFP 蛍光像)。

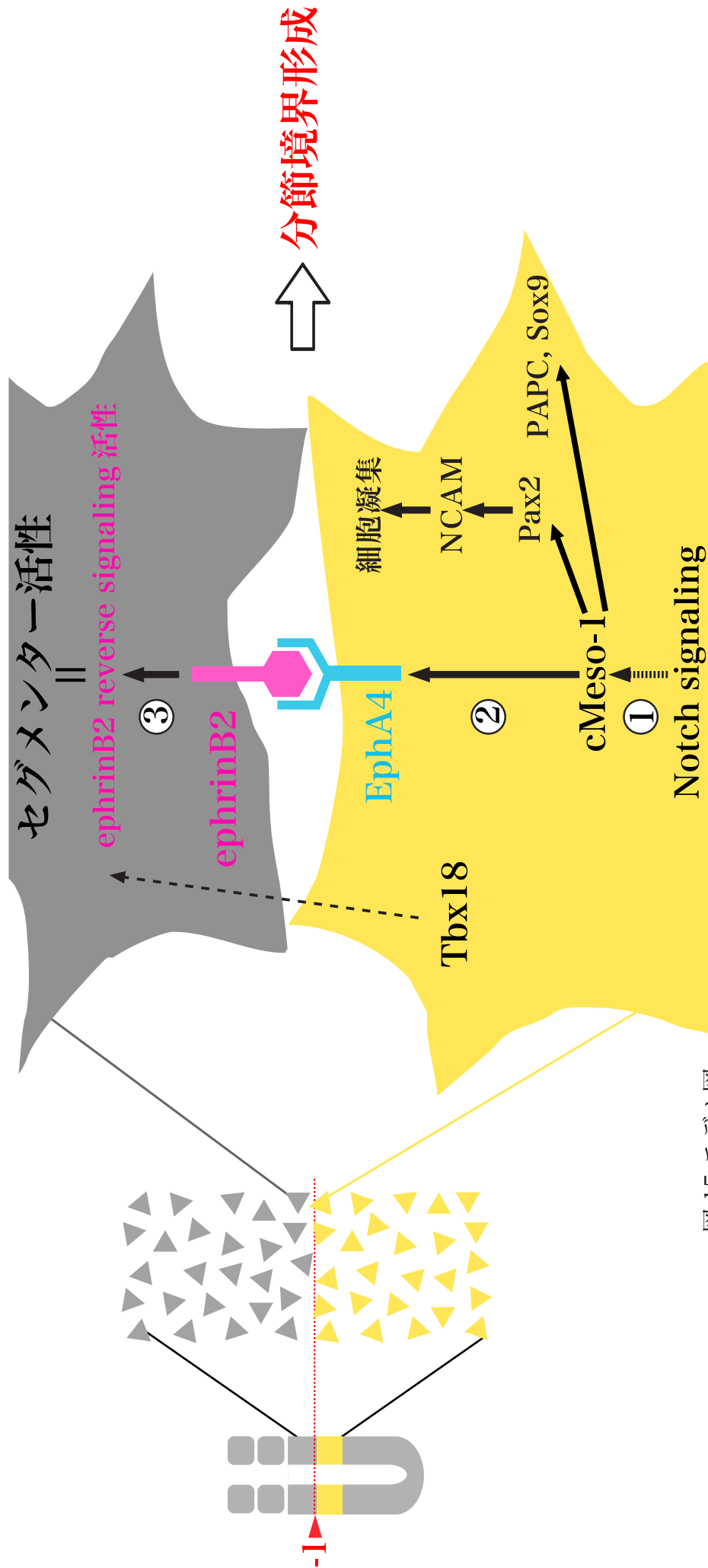


図 15 モデル図

(1) Notch signaling 等の影響によりレベル-1 後方の細胞で特異的に cMeso-1 が発現する。  
 (2) cMeso-1 が EphA4 の発現を誘導する。  
 (3) EphA4 が隣接したレベル-1 前方の細胞において ephrinB2 reverse signaling を活性化する。この ephrinB2 reverse signaling 活性がセグメンター活性を引き起こすことができると考えられる。また、Tbx18 はセグメンター活性を誘導する。さらに、cMeso-1 は EphA4 以外に PAXC, Pax2 及び Sox9 の発現を誘導するが、これらの遺伝子はセグメンターと直接は関わっていないようである。おそらく別の役割があると考えられる。例えば、cMeso-1 は Pax2 を介して NCAM の発現を誘導し、体節構成細胞同士の接着を制御していると考えられる。

## 材料と方法

### 発現プラスミド作成

rtTAとtTA, d2EGFP, DsRed2及びpTRE-EGFP (pBI-EGFP) のcDNAは、Clontechから購入した。rtTA, tTA, rtTA2S-M2 (Urlinger et al., 2000), DsRed2, chick EphA4 (Ohta et al., 1996), chick EphA4 $\Delta$ ICD, quail Sox9 (Sakai et al., 2006), chick Tbx18 (Tanaka and Tickle, 2004) cDNAを、それぞれpCAGGS (Niwa et al., 1991) 内に挿入した。Human RhoA, human caRhoA (Izawa et al., 1998), cMeso-1 (Buchberger et al., 1998), chick Pax 2 (Okafuji et al., 1999), zebrafish PAPC (Yamamoto et al., 1998), mouse caNotch (Notch1 $\Delta$ E) (Schroeter et al., 1998), mouse dnRBP (Chung et al., 1994), chick ephrinB2 (Baker and Antin, 2003), ephrinB2 $\Delta$ ICD cDNAを、それぞれ pBI-EGFP内に挿入した。chickのEphA4 $\Delta$ ICDとephrinB2 $\Delta$ ICDは、zebrafishのtruncated EphA4とtruncated ephrinB2a (Barrios et al., 2003) を参考にして、細胞内ドメインを除いたEphA4とephrinB2のORFを作成した。

### ニワトリ胚の顕微操作

発生段階の記述は、Hamburger & Hamilton の文献 (Hamburger and Hamilton, 1992) に従った。ニワトリ有精卵 (城山鶏園) を 38.5°Cでインキュベーションをして、目的の stage の胚を得た。インキュベーションをしたニワトリの卵から注射器で卵白を 3 ml ほど抜き、眼科ハサミを使って卵殻に円状の小窓を開け、胚を可視化するために黒インク (holbein 社, I354) を Hanks' 溶液 (140mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6mM glucose, 0.34mM NaHPO<sub>4</sub>, 10mM HEPES, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>; pH7) に 1 : 5 の割合になるように希釈し、キャピラリー (DIAMOND SCIENTIFIC 社のマイクロヘマトクリット用キャピラリーを L 字型に加工したもの) を用いて卵黄嚢内の胚の直下に注入した。胚の操作後は、卵殻に開けた小窓を梱包用テープ (Scotch 社, 50.8mm×65.8m) で密閉し、インキュベーションを続けた。



## 体節中胚葉への *in ovo* electroporation

Electroporation 法は、佐藤らの方法に従い行った (Nakaya et al., 2004; Sato et al., 2002)。卵を 38.5°C で約 25 時間のインキュベーションを行い、stage 8 (3-4 体節) のニワトリ胚に cDNA を共導入した。DNA 溶液は 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整し、Fast Green FCF (wako) で色付けをした。この溶液を、ガラスキャピラリーを用いて原条内の体節予定域にのせる。それからプラス極 (白金) は胚の下側にセットし、マイナス極 (とがらせたタングステン針) は DNA 溶液の近くにセットした。そして 6V、25m 秒のパルス を 3 度かけた。その後 38.5°C で 18 時間のインキュベーションを行い、stage 12 (約 15 体節) まで発生を続けさせ、500  $\mu\text{l}$  の Hanks' 溶液に溶かした doxycycline (Dox) を卵黄嚢内の胚の直下に注入した。そして、回収するまでインキュベーションを続けた。

## EGFPの観察と検出

Wholeのニワトリ胚の写真は実体顕微鏡 (Nikon SMZ7500) に取り付けた CCD カメラ (Zeiss AxioCam) によって撮影した。Exposure time, gainと倍率はほぼ一定であり、JPEG imageとしてPhotoshop (画像処理ソフト) 上で編集した。

Western blotting によりEGFPの発現量を検出するために、electroporation をされた体節中胚葉をそれぞれ同じサイズに切り出して、lysis buffer (50 mM Tris-Hcl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP-40, 100 mM NaCl, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 10 mM p-amidinophenyl-methanesulfonyl fluoride) 内でホモジナイズを行い、4°Cにおいて20,000 gで4 min、遠心回転を行い、上清液に2×Laemmli sample bufferを1:1の割合で混ぜ、を10 minボイルした。それぞれの抽出液を10%ポリアクリルアミドゲルで泳動したのち、ニトロセルロースメンブレン (Schleicher and Schuell) にトランスファーした (トランスファーバッファー; 8.2mM Tris, 0.2M グリシン, 20% メタノール, 180mA 定電流, 4°C, 2時間)。トランスファー後のメンブレンを5%スキムミルク/PBST (PBS, 0.1%Tween 20) に浸して1時間ブロッキングし、anti-GFP monoclonal 抗体 (マウス; Clontech) を1:1000の割合に希釈して反応させた (室温、2時間)。PBSTで10分間、3回洗浄したのち、horseradish peroxidase (HRP) 標識 anti-mouse IgG抗体 (ウサギ; Amersham) を1:500の割合に希釈して反応させた (室温、2時間)。ECLキット (Amersham) を用いて化学発

光させ、luminous image analyzer LAS-3000mini (Fuji Film) によって検出と濃度測定をした。

### パラフィン組織学切片の anti-EGFP 抗体染色

胚を Carnoy's 溶液 (10%酢酸, 30%クロロホルム, 60%エタノール) で固定後、70%、90%、100%の順にエタノールで脱水し、キシレンで処理してパラフィンに包埋した。Microtome (MICROM, HM325) で厚さ  $8\mu\text{m}$  の切片にした。伸展後の切片をキシレンにより脱パラフィン処理し、100%、90%、70%の順にエタノールで再水和してから PBS に置換した。2%スキムミルク/PBS でブロッキングしたあと、anti-EGFP 抗体 (マウス; Clontech) を 1:1000 の割合に希釈して反応させた (室温、2 時間)。PBS で洗浄後、HRP 標識 anti-mouse IgG 抗体 (ウサギ; DAKO) を 1:300 の割合に希釈して反応させた (室温、2 時間)。PBS で洗浄し、0.09mg/ml 3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) / 0.004% $\text{H}_2\text{O}_2$  / PBS 溶液中において発色反応を行った (遮光、室温、約 15 分)。発色後、流水洗浄し、70%、90%、100%の順にエタノールで脱水した。キシレンで処理して最後にエンテランニュー (Merck) で封入した。Axiophot 正立顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて観察・撮影を行った。

### 凍結組織学切片の蛍光抗体染色

4%パラホルムアルデヒド/PBS で室温のまま 10 分間固定し、PBS で洗浄した。30%Sucrose に置換し、OCT (Tissue Teck) で包埋し凍らせてから、Cryostat (MICROM, HM500 OM) で  $10\mu\text{m}$  の切片を作成した。PBS に置換したのち、10%Lamb serum (GIBCO) / PBS で 1 時間ブロッキングし、一次抗体; anti-active Caspase 3 polyclonal 抗体 (1:250, ウサギ; Promega); anti-Pax2 polyclonal 抗体 (1:200, ウサギ; ZYMED); anti-NCAM monoclonal 抗体 (1:200, マウス; DSHB); anti-N-cadherin monoclonal 抗体 (1:300, マウス; SIGMA); anti-E-cadherin monoclonal 抗体 (1:500, マウス; BD biosciences); anti-Laminin polyclonal 抗体 (1:500, ウサギ; SIGMA) をそれぞれの割合で希釈して反応させた (室温、2 時間)。切片を PBS で洗浄後、続いて二次抗体: Alexa 568 蛍光標識 anti-rabbit IgG 抗体, Alexa 568 蛍光標識 anti-mouse IgG 抗体, Alexa 642 蛍光標識 anti-mouse IgG 抗体 (ヤギ; Molecular Probes) を 1:500 の割合に希釈して反応させた (遮光、室温、2 時間)。PBS で洗浄後、

5  $\mu$ g/ml DAPI (SIGMA) / 50mg/ml 退色防止剤 DABCO (SIGMA) / 封入剤 FluorSave Reagent (CALBIOCHEM) を用いて封入した。Axioplan2 Apotome 正立顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて観察・撮影を行った。

### Whole-mount *in situ* hybridization

*cMeso-1*, *Pax2*, *EphA4*, *Sox9* 及び *ephrinB2* に対する *In situ* hybridization 用の digoxigenin (Dig) 標識プローブはすでに報告されているものを用いた (Buchberger et al., 1998; Sakai et al., 2006; Suetsugu et al., 2002) (佐藤有紀, 2003, 奈良先端大 博士論文)。chick *Tbx18* と chick PAPC のプローブは以下の cDNA を鋳型にして作成した。chick *Tbx18* の cDNA 断片 (GenBank database の accession number AY173127における 412-875 間の 462bp) は田村宏治博士から提供されてものである。chick PAPC の cDNA 断片は、cDNA プール (stage 14 のニワトリ胚) からプライマー (5'-GACAGCGGCAAGGAG ACAGTGATTTCAATGACAGTGACTCGG-3' と 5'-CCAAGGAATGTGGTTGAGGGGCCGGGTAGAGGGGCACCCC-3', BBSRC chick EST database の配列 603506749F1 を参考に設計した) を用いて RT-PCR により 473bp の断片を得た。

Whole-mount *in situ* hybridization の手順は、Henrique らの方法 (Henrique et al., 1995) を改良して行った (Nakaya et al., 2004; Sato et al., 2002; Tonegawa et al., 1997)。4% paraformaldehyde (PFA) / PBS を用いて固定し (4°C, 2 時間)、PBT (0.1% Tween 20 in PBS) で洗浄した (室温、10 分、3 回)。50% methanol / PBT, 100% methanol の順に置換して、6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / methanol で漂白し (室温, 1 時間)、50% methanol / PBT、PBT の順に置換した。その後、プローブの浸透性を上げるため、proteinase K (20  $\mu$ g/ml で処理し (室温、15 分)、0.2% glutaraldehyde/4% PFA / PBS で再固定した (室温、20 分間)。PBT で洗浄後、サンプルを hybridization buffer (ULTRAhybri, Ambion) / PBT=1 / 1 に 5 分、hybridization buffer でプレハイブリダイゼーションを行った (68°C, 1 時間)。それから、Dig 標識 RNA プローブを加えてプレハイブリダイゼーションを行った (68°C, 12 時間)。その後、サンプルを wash buffer (50% formamide, 5 $\times$  SSC, 1% EDTA, 0.2% Tween 20, 0.5% CHAPS) で洗浄し (68°C, 30 分, 3 回), wash buffer / MABT (0.1 M Maleic Acid (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 1% Tween 20) =1 / 1 に移して 65°C に 30 分置いたのち、室温に冷ました。MABT でさらに洗浄し (室温、15 分間、3 回)、プレブロッキング (preblocking solution; 2% blocking reagent (BBR, Roche) /



MABT 内に室温、1 時間)、ブロッキング (blocking solution; FBS/ 2% blocking reagent / MABT 内に室温、1 時間) を行った。抗体反応は、blocking solution 内に phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (Roche) を 1:1000 の割合で希釈されるように加えて 4 °C, 一晩行った。次に、MABT で洗浄し (室温、1 時間、5 回)、NTMT (100 mM Tris-HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20) で洗浄した (室温、10 分、3 回)。発色は、サンプルを 0.45 mg/ml nitroblue-tetrazolium chloride (Roche) and 0.175 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (Roche) / NTMT に入れて暗所で行った。PBS で洗浄して (室温、10 分、3 回)、発色を止め、0.1% glutaraldehyde / 4% PFA / PBS 内で再固定した (室温、30 分)。

## RNAi by shRNA

iGene社から得た情報を参考に、shRNAを設計し、片平らの方法に従って、shRNA発現プラスミドを作成した (Katahira and Nakamura, 2003)。Pax2 open reading frame (ORF) 内の600–619間, 701-720間に位置する2種類の19塩基の配列 (#600; GAGGAAACGTGATGAAGAT, #701; CCCAGCAGCAGC TGG AAGC) を選んだ。EphA4のORF内からは923-941間に位置する1種類の19塩基の配列 (TCCTGGAGTACGAAGTCAA) を選んだ。Control-shRNA用の19塩基の配列はGCAATGACGCAGGTGACCAである。これらの配列はBLAST searchで他の遺伝子とほとんどhomologyがなかった。それぞれの配列をもとにsenseとantisenseのsiRNA配列を決め、これらの間を繋ぐグループになる9塩基の配列 (TTCAAGAGA) と、3'末端にターミネーションシグナルとなる6塩基 (TTTTTT) を加え、さらに5'と3'のそれぞれ両末端に切断された状態の制限酵素サイト *EcoRI* (3'突出部分; AATT) と *ApaI* (5'突出部分; GGCC) ができるように Forward配列 と reverse配列を設計し、annealing buffer (50 mM Tris-Hcl [pH 7.5], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, 100 mM NaCl) 内で2時間かけて90°C徐々に37°Cまで冷やしてアニーリングを行い、pSilencer1.0-U6 siRNA expression vector (Ambion) の *ApaI* と *EcoRI* サイトの間に挿入した。

*Pax2*-shRNA発現プラスミドをpTRE-EGFP-*Pax2* とpCAGGS-rtTA2S-M2と共に DF-1 (ニワトリ繊維芽細胞株) へtransfectionする際は、Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いた。24時間後、Dox / Hank's生理食塩水 (0.1 ng/ $\mu$ l) をmediumに加え、さらに12時間インキュベーションを行い、DF-1を回収した。*Pax2*のWestern blottingの際には、一次抗体としてanti-*Pax2* polyclonal

抗体 (1:200, ウサギ; ZYMED), 二次抗体としてHRP標識 anti-rabbit IgG抗体 (1:500, ヤギ; DAKO) を用いた。EGFPのWestern blottingに関しては、上述の「EGFPの観察と検出」と同様である。

#### ニワトリ胚間の未分節中胚葉組織の交換移植 (セグメンター・アッセイ)

セグメンター・アッセイの手順は、佐藤らの方法 (Nakaya et al., 2004; Sato et al., 2002; Tonegawa et al., 1997) に Tet-on を組み合わせて行った。まず、遺伝子導入後の stage 13 (約 20 体節) の胚を卵から取り出し、PBS に浸けた。ビテリン膜を剥がし、未分節中胚葉の-1.5 付近を顕微バサミでおおまかに切り取った。0.15%ディスペース (GIBCO) / PBS で (室温、約 7 分) 処理し、組織間の結合が弱まるようにした。反応液と等量の FBS を加えて、ディスペースの酵素反応を停止させた。Hanks' 溶液で数回洗い、タングステン針を用いて表皮外胚葉、内胚葉を剥がし、側板中胚葉、神経管、脊索を切り離し、未分節中胚葉の-2.5 付近だけを切り出した。この組織片をキャピラリーによって宿主胚 (stage 13) の上に運び、タングステン針で左側未分節中胚葉のレベル-2.5 の組織と交換移植をした。Dox 溶液を宿主胚の黄身に注射し、その後 38.5°C で約 6 時間発生を続けさせ、観察を行った。なお、発現を誘導した遺伝子が機能するまでのタイムラグを考慮して、移植する 1.5 時間前のドナー胚においても、Dox 溶液を注射した。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、実験で用いた rtTA2S-M2 cDNA は Wolfgang Hillen 博士 (Institut für Mikrobiologie, Unive. Erlangen) から、cMeso-1 cDNA は Astrid Buchberger 博士 (Dep. of Cell and Mole. Bio., Tech. Univ. of Braunschweig) から、human RhoA と caRhoA (RhoV14) は貝淵弘三 教授 (名古屋大・医・細胞薬理) から、chick Pax2 cDNA はの中村春和 教授 (東北大・加齢研究所) から mouse caNotch (Notch1 $\Delta$ E) は Raphael Kopan 博士 (Dep. of Mol. Bio. and Phar., Washington Univ.) から、quail Sox9 cDNA は若松義雄 講師 (東北大・医・器官構築) から、chick Tbx18 cDNA は田中幹子 助教授 (東工大・生命理工・生体システム) から、EphA4 cDNA は太田訓正助教授 (熊本大・医薬・神経分化) から、Notch レポーター (TP1-Venus) は神山淳 助手 (奈良先端大・分子神経分化) と岡野栄之 教授 (慶應大・医・生理) から、dnRBP (RBP-J $\kappa$  R218H) は川市正史 教授 (奈良先端大・動物遺伝子機能) と本庶佑 教授 (京大・医・分子生物) から提供していただきました。また、貴重な実験データを末次里奈子 先輩、仲矢由紀子 博士、佐藤有紀 博士より提供していただきました。御礼申し上げます。

中川真一 博士と田辺光司 博士には Tet システムについて、桐田あかね 博士、佐藤有紀 博士、田所竜介 博士、仲矢由紀子 博士、河西利治 先輩、末次里奈子 先輩、及び吉野剛史 先輩にはニワトリ胚の操作法から、実験の細部にわたるまで丁寧に教えていただきました。本当にありがとうございました。特に佐藤有紀 博士には、日々の研究において大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

その他の分子発生学講座の先輩、後輩、同学年の方々、にも大変お世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

秘書の谷本史さん、明楽直美さんやコンピュータスタッフの内山朱美さんにも事務手続き等で大変お世話になりました。ありがとうございました。

片岡浩介 助教授や影山裕二 助手には実験の進め方、データの解釈のしかたなどの御指導をいただきました。心より御礼申し上げます。

また、このような研究の機会を与えてくださった安田國雄学長にも感謝いたします。

最後に、直接の御指導をいただいた高橋淑子 教授に、心より感謝申し上げます。理論的な考え方、プレゼンテーション法、さらには研究者としての姿勢まで幅広く御指導いただきました。本当にありがとうございました。

## 参考文献

- Aoyama, H., et al., 2005. Three developmental compartments involved in rib formation. *Int J Dev Biol.* 49, 325-333.
- Aulehla, A., Herrmann, B. G., 2004. Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes Dev.* 18, 2060-2067.
- Babb, S. G., Marrs, J. A., 2004. E-cadherin regulates cell movements and tissue formation in early zebrafish embryos. *Dev Dyn.* 230, 263-277.
- Baker, R. K., Antin, P. B., 2003. Ephs and ephrins during early stages of chick embryogenesis. *Dev Dyn.* 228, 128-142.
- Barrios, A., et al., 2003. Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Curr Biol.* 13, 1571-1582.
- Bell, D. M., et al., 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 16, 174-178.
- Bessho, Y., Kageyama, R., 2003. Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev.* 13, 379-384.
- Bi, W., et al., 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22, 85-89.
- Blair, S. S., 2003. Developmental biology: boundary lines. *Nature.* 424, 379-381.
- Blair, S. S., 2004. Developmental biology: Notching the hindbrain. *Curr Biol.* 14, R570-572.
- Borycki, A. G., et al., 1999. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development.* 126, 1665-1674.
- Buchberger, A., et al., 1998. cMeso-1, a novel bHLH transcription factor, is involved in somite formation in chicken embryos. *Dev Biol.* 199, 201-215.
- Burgess, R., et al., 1995. Paraxis: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. *Dev Biol.* 168, 296-306.
- Burgess, R., et al., 1996. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature.* 384, 570-573.
- Catala, M., et al., 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development.* 122, 2599-2610.
- Chan, T., et al., 2006. Ledgerline, a novel *Xenopus laevis* gene, regulates differentiation of presomitic mesoderm during somitogenesis. *Zoolog Sci.* 23, 689-697.

- Chang, J., et al., 2006. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14495-14500.
- Chung, C. N., et al., 1994. Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res.* 22, 2938-2944.
- Coleman, M. L., Olson, M. F., 2002. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 9, 493-504.
- Correia, K. M., Conlon, R. A., 2000. Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of somites. *Mech Dev.* 91, 19-30.
- Cowan, C. A., Henkemeyer, M., 2001. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature.* 413, 174-179.
- Dahmann, C., Basler, K., 1999. Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet.* 15, 320-326.
- Dale, J. K., et al., 2006. Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Dev Cell.* 10, 355-366.
- Danker, K., et al., 1992. Effects of heat shock on the pattern of fibronectin and laminin during somitogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* 193, 136-144.
- De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E., 2000. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.* 16, 389-395.
- Del Re, D. P., et al., 2007. RhoA /Rho kinase upregulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 282, 8069-8078.
- Delfini, M. C., et al., 2005. Control of the segmentation process by graded MAPK/ERK activation in the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 11343-11348.
- Diez del Corral, R., et al., 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron.* 40, 65-79.
- Duband, J. L., et al., 1987. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J Cell Biol.* 104, 1361-1374.
- Dubrulle, J., et al., 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation.



- Cell. 106, 219-232.
- Durbin, L., et al., 1998. Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Genes Dev.* 12, 3096-3109.
- Durbin, L., et al., 2000. Anteroposterior patterning is required within segments for somite boundary formation in developing zebrafish. *Development.* 127, 1703-1713.
- Ellis, S., Mellor, H., 2000. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol.* 10, 85-88.
- Fei, Z., et al., 2007. Conditional RNA interference achieved by Oct-1 POU/rtTA fusion protein activator and a modified TRE-mouse U6 promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 906-912.
- Flenniken, A. M., et al., 1996. Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev Biol.* 179, 382-401.
- Foo, S. S., et al., 2006. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell.* 124, 161-173.
- Furth, P. A., et al., 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 9302-9306.
- Fuse, T., et al., 2004. Conditional activation of RhoA suppresses the epithelial to mesenchymal transition at the primitive streak during mouse gastrulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 665-672.
- Galceran, J., et al., 2004. LEF1-mediated regulation of Delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis. *Genes Dev.* 18, 2718-2723.
- Genzer, M. A., Bridgewater, L. C., 2007. A Col9a1 enhancer element activated by two interdependent SOX9 dimers. *Nucleic Acids Res.* 35.
- Giudicelli, F., Lewis, J., 2004. The vertebrate segmentation clock. *Curr Opin Genet Dev.* 14, 407-414.
- Goh, K. L., et al., 1997. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development.* 124, 4309-4319.
- Gossen, M., Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 5547-5551.
- Gossen, M., et al., 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 268, 1766-1769.
- Graef, I. A., et al., 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell.* 105, 863-875.

- Hall, A., 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33, 891-895.
- Hamaguchi, Y., et al., 1991. Cloning and characterization of a protein binding to the J kappa recombination signal sequence of immunoglobulin genes. *Adv Exp Med Biol.* 292, 177-186.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 195, 231-272.
- Hansen, C. S., et al., 1997. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development.* 124, 483-492.
- Healy, C., et al., 1996. Expression of the chicken Sox9 gene marks the onset of cartilage differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 785, 261-262.
- Healy, C., et al., 1999. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn.* 215, 69-78.
- Henrique, D., et al., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature.* 375, 787-790.
- Hilgers, V., et al., 2005. In vivo analysis of mRNA stability using the Tet-Off system in the chicken embryo. *Dev Biol.* 284, 292-300.
- Hinrichs, W., et al., 1994. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science.* 264, 418-420.
- Hirano, S., et al., 1998. Normal ontogenic observations on the expression of Eph receptor tyrosine kinase, Cek8, in chick embryos. *Anat Embryol (Berl).* 197, 187-197.
- Holder, N., Klein, R., 1999. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development.* 126, 2033-2044.
- Irvine, K. D., Rauskolb, C., 2001. Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 189-214.
- Irvine, K. D., Vogt, T. F., 1997. Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 867-876.
- Ito, M., et al., 2007. Xenopus Suppressor of Hairless 2 is involved in the cell fate decision during gastrulation through the transcriptional regulation of Xoct25/91. *Biochem Biophys Res Commun.* 353, 644-649.
- Izawa, I., et al., 1998. Possible involvement of the inactivation of the Rho-Rho-kinase pathway in oncogenic Ras-induced transformation. *Oncogene.* 17, 2863-2871.
- Jacobson, M., Rutishauser, U., 1986. Induction of neural cell adhesion molecule (NCAM) in Xenopus embryos. *Dev Biol.* 116, 524-531.

- Janes, P. W., et al., 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 123, 291-304.
- Johnson, J., et al., 2001. The anterior/posterior polarity of somites is disrupted in paraxis-deficient mice. *Dev Biol*. 229, 176-187.
- Jopling, C., den Hertog, J., 2005. Fyn/Yes and non-canonical Wnt signalling converge on RhoA in vertebrate gastrulation cell movements. *EMBO Rep*. 6, 426-431.
- Katahira, T., Nakamura, H., 2003. Gene silencing in chick embryos with a vector-based small interfering RNA system. *Dev Growth Differ*. 45, 361-367.
- Kato, H., et al., 1997. Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development*. 124, 4133-4141.
- Kawaichi, M., et al., 1992. Genomic organization of mouse J kappa recombination signal binding protein (RBP-J kappa) gene. *J Biol Chem*. 267, 4016-4022.
- Kawakami, K., 2005. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn*. 234, 244-254.
- Kawakami, K., et al., 2004a. Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene*. 338, 93-98.
- Kawakami, K., Noda, T., 2004. Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics*. 166, 895-899.
- Kawakami, K., et al., 2000. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 11403-11408.
- Kawakami, K., et al., 2004b. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell*. 7, 133-144.
- Kim, S. H., et al., 2000. The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr Biol*. 10, 821-830.
- Kim, S. H., et al., 1998. The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development*. 125, 4681-4690.
- Kitajima, S., et al., 2000. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*. 127, 3215-3226.
- Koga, A., et al., 1996. Transposable element in fish. *Nature*. 383, 30.
- Kohyama, J., et al., 2005. Visualization of spatiotemporal activation of Notch

- signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev Biol.* 286, 311-325.
- Koshida, S., et al., 2005. Integrin $\alpha$ 5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell.* 8, 587-598.
- Kragtorp, K. A., Miller, J. R., 2006. Regulation of somitogenesis by Ena/VASP proteins and FAK during *Xenopus* development. *Development.* 133, 685-695.
- Krull, C. E., 2001. Segmental organization of neural crest migration. *Mech Dev.* 105, 37-45.
- Kulesa, P. M., Fraser, S. E., 2002. Cell dynamics during somite boundary formation revealed by time-lapse analysis. *Science.* 298, 991-995.
- Kullander, K., Klein, R., 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 475-486.
- Kulyk, W. M., et al., 2000. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp Cell Res.* 255, 327-332.
- Larsen, C. W., et al., 2001. Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J Neurosci.* 21, 4699-4711.
- LeDouarin, N. M., Kalcheim, C., 1999. *The Neural Crest.* Cambridge University Press. 2nd Edition.
- Lee, H. S., et al., 2006. Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nat Cell Biol.* 8, 55-63.
- Lefebvre, V., et al., 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro  $\alpha$ 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol.* 17, 2336-2346.
- Li, W., et al., 2007. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation. *Biochem Pharmacol.* 73, 491-503.
- Lu, Q., et al., 2001. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell.* 105, 69-79.
- Mancia, F., Shapiro, L., 2005. ADAM and Eph: how Ephrin-signaling cells become detached. *Cell.* 123, 185-187.
- Manjon, C., et al., 2007. Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 9, 57-63.
- Marquardt, T., et al., 2005. Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell.* 121, 127-139.

- Marston, D. J., et al., 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol.* 5, 879-888.
- Matsuda, Y., et al., 2005. Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development.* 132, 2783-2793.
- McNeill, H., 2000. Sticking together and sorting things out: adhesion as a force in development. *Nat Rev Genet.* 1, 100-108.
- Medina, A., et al., 2004. Xenopus paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *Embo J.* 23, 3249-3258.
- Mellitzer, G., et al., 1999. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature.* 400, 77-81.
- Meyer, S., et al., 2005. Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol.* 27, 1197-1206.
- Meyers, E. N., et al., 1998. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet.* 18, 136-141.
- Miller, S. A., Briglin, A., 1996. Apoptosis removes chick embryo tail gut and remnant of the primitive streak. *Dev Dyn.* 206, 212-218.
- Momose, T., et al., 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ.* 41, 335-344.
- Montero, J. A., et al., 2005. Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. *Development.* 132, 1187-1198.
- Morales, A. V., et al., 2007. Snail genes at the crossroads of symmetric and asymmetric processes in the developing mesoderm. *EMBO Rep.* 8, 104-109.
- Morimoto, M., et al., 2005. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature.* 435, 354-359.
- Muramatsu, T., et al., 1998. In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int J Mol Med.* 1, 55-62.
- Nagai, T., et al., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 20, 87-90.
- Nakajima, Y., et al., 2006. Identification of Epha4 enhancer required for segmental expression and the regulation by Mesp2. *Development.* 133, 2517-2525.
- Nakamura, H., et al., 2005. Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Res Brain Res Rev.* 49, 120-126.
- Nakaya, Y., et al., 2004. Mesenchymal-epithelial transition during somitic



- segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell.* 7, 425-438.
- Niwa, H., et al., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108, 193-199.
- Nomura-Kitabayashi, A., et al., 2002. Hypomorphic *Mesp* allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development.* 129, 2473-2481.
- Obata, S., et al., 1995. Protocadherin *Pcdh2* shows properties similar to, but distinct from, those of classical cadherins. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 12), 3765-3773.
- Ohta, K., et al., 1996. The receptor tyrosine kinase, *Cek8*, is transiently expressed on subtypes of motoneurons in the spinal cord during development. *Mech Dev.* 54, 59-69.
- Okafuji, T., et al., 1999. Roles of *Pax-2* in initiation of the chick tectal development. *Brain Res Dev Brain Res.* 116, 41-49.
- Orth, P., et al., 1998. Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *J Mol Biol.* 279, 439-447.
- Palmer, A., et al., 2002. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell.* 9, 725-737.
- Poliakov, A., et al., 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell.* 7, 465-480.
- Poliakov, A., Wilkinson, D. G., 2006. Ephrins make eyes with planar cell polarity. *Nat Cell Biol.* 8, 7-8.
- Psychoyos, D., Stern, C. D., 1996. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development.* 122, 1523-1534.
- Rhee, J., et al., 2003. The protocadherin *papc* is involved in the organization of the epithelium along the segmental border during mouse somitogenesis. *Dev Biol.* 254, 248-261.
- Rhinn, M., et al., 2006. Global and local mechanisms of forebrain and midbrain patterning. *Curr Opin Neurobiol.* 16, 5-12.
- Saga, Y., et al., 1996. *MesP1*: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development.* 122, 2769-2778.
- Saga, Y., et al., 1997. *Mesp2*: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 11, 1827-1839.
- Saga, Y., Takeda, H., 2001. The making of the somite: molecular events in vertebrate

- segmentation. *Nat Rev Genet.* 2, 835-845.
- Sakai, D., et al., 2006. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development.* 133, 1323-1333.
- Sanders, E. J., 1997. Cell death in the avian sclerotome. *Dev Biol.* 192, 551-563.
- Sanders, E. J., Parker, E., 2001. Ablation of axial structures activates apoptotic pathways in somite cells of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl).* 204, 389-398.
- Sanson, B., 2001. Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep.* 2, 1083-1088.
- Sato, Y., et al., 2007. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos  
. *Developmental Biology* in press.
- Sato, Y., Takahashi, Y., 2005. A novel signal induces a segmentation fissure by acting in a ventral-to-dorsal direction in the presomitic mesoderm. *Dev Biol.* 282, 183-191.
- Sato, Y., et al., 2002. Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development.* 129, 3633-3644.
- Satoh, W., et al., 2006. Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development.* 133, 989-999.
- Sawada, A., et al., 2000. Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites. *Development.* 127, 1691-1702.
- Sawada, A., et al., 2001. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development.* 128, 4873-4880.
- Sawada, K., Aoyama, H., 1999. Fate maps of the primitive streak in chick and quail embryo: ingression timing of progenitor cells of each rostro-caudal axial level of somites. *Int J Dev Biol.* 43, 809-815.
- Schmidt, C., et al., 2001. Regulation of Epha4 expression in paraxial and lateral plate mesoderm by ectoderm-derived signals. *Dev Dyn.* 220, 377-386.
- Schmidt, C., et al., 2004. Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. *Dev Biol.* 271, 198-1209.
- Schroeter, E. H., et al., 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic

- release of intracellular domain. *Nature*. 393, 382-386.
- Shimizu, T., et al., 2005. E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mech Dev*. 122, 747-763.
- Soans, C., et al., 1996. Developmental expression and distinctive tyrosine phosphorylation of the Eph-related receptor tyrosine kinase Cck9. *J Cell Biol*. 135, 781-795.
- Sosic, D., et al., 1997. Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. *Dev Biol*. 185, 229-243.
- Stein, E., et al., 1998. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev*. 12, 667-78.
- Stern, C. D., 2005. The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell*. 8, 9-17.
- Suetsugu, R., et al., 2002. Pax 2 expression in mesodermal segmentation and its relationship with EphA4 and Lunatic-fringe during chicken somitogenesis. *Mech Dev*. 119 Suppl 1, S155-159.
- Takahashi, Y., 2005. Common mechanisms for boundary formation in somitogenesis and brain development: shaping the 'chic' chick. *Int J Dev Biol*. 49, 221-230.
- Takahashi, Y., et al., 2005. Mesenchymal-to-epithelial transition during somitic segmentation: a novel approach to studying the roles of Rho family GTPases in morphogenesis. *Cells Tissues Organs*. 179, 36-42.
- Tamura, K., et al., 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*. 5, 1416-1423.
- Tanaka, M., Tickle, C., 2004. Tbx18 and boundary formation in chick somite and wing development. *Dev Biol*. 268, 470-480.
- Tepass, U., et al., 2002. Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Curr Opin Genet Dev*. 12, 572-582.
- Tokunaga, A., et al., 2004. Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem*. 90, 142-154.
- Tonegawa, A., et al., 1997. Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development*. 124, 1975-1984.

- Tonegawa, A., et al., 2003. Systematic screening for signaling molecules expressed during somitogenesis by the signal sequence trap method. *Dev Biol.* 262, 32-50.
- Uchikawa, M., et al., 2003. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell.* 4, 509-519.
- Uchikawa, M., et al., 2004. Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mech Dev.* 121, 1145-1158.
- Unterseher, F., et al., 2004. Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *Embo J.* 23, 3259-3269.
- Urasaki, A., et al., 2006. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics.* 174, 639-649.
- Urlinger, S., et al., 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 7963-7968.
- Vargesson, N., et al., 1998. Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev.* 77, 197-199.
- Vermot, J., Pourquie, O., 2005. Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature.* 435, 215-220.
- Wilkinson, D. G., 2001. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci.* 2, 155-164.
- Wilkinson, D. G., 2003. How attraction turns to repulsion. *Nat Cell Biol.* 5, 851-853.
- Wright, E., et al., 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 9, 15-20.
- Xu, Q., et al., 1999. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature.* 399, 267-271.
- Xu, R. H., et al., 1995. A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochem Biophys Res Commun.* 212, 212-219.
- Yamamoto, A., et al., 1998. Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development.* 125, 3389-3397.
- Yang, J. T., et al., 1999. Overlapping and independent functions of fibronectin

- receptor integrins in early mesodermal development. *Dev Biol.* 215, 264-277.
- Yasuda, K., et al., 2000. Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Dev Growth Differ.* 42, 203-206.
- Yasuhiko, Y., et al., 2006. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 3651-3656.
- Yin, Y., et al., 2004. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res.* 48, 285-296.
- Zhu, S., et al., 2006. RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal.* 18, 359-372.
- Zimmer, M., et al., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol.* 5, 869-878.