

体幹部のパターン形成における Sfrp1 サブファミリーの役割

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

佐藤 渉

序論

細胞と細胞のコミュニケーションは、胚形成に関わる細胞分化、細胞極性の形成、細胞の挙動、胚のパターン形成に必要である。このコミュニケーションは、主にリガンド、受容体、阻害因子といったシグナル分子によって担われる。リガンドと受容体の相互作用はシグナルの活性に大きく効果を及ぼすが、分泌性阻害因子によるシグナル活性の調節も、適切な細胞間コミュニケーションに不可欠である (Niehrs, 1999; Perea-Gomez et al., 2002)。

脊椎動物の体は、椎骨による頭尾軸に沿った繰り返し構造からなる。この繰り返し構造は、もともと体節に由来する椎骨とその関連の筋肉などから構成され、その体節は、未分節中胚葉から一定間隔で分節化することにより生じる。これら体節形成と体節における細胞分化においては、組織間のシグナル活性の調節が不可欠と予想されている。一方、繰り返し構造の形成には、頭尾軸が伸長することも必須である。しかし、体節形成と頭尾体軸伸長は密接に関連した胚形成の主要なイベントであるにもかかわらず、それらが、分子作用として如何に関連付けられるかは、ほとんど分かっていない。現在、体節の分節化位置の決定には、Wntのシグナルによる濃度勾配が必要と考えられている (Aulehla et al., 2003 ; Dubrulle and Pourquie, 2004)。私は、体節形成と頭尾体軸伸長においては、Wntシグナルが厳密に調節されるであろうと予想する。そして、Wnt阻害因子Sfrpが体節形成と頭尾体軸伸長にどの様に必要になっているのかを解明することを、研究の目的とした。

Wntは、分泌性糖タンパク質の一種で、7回膜貫通型受容体であるFrizzledを介してシグナルを伝達する (Kawano and Kypta, 2003)。これまでに、ヒトとマウスにおいて、19種類のWnt遺伝子が同定されている。Wntを介した細胞内シグナルは、canonical経路とnon-canonical経路に分けられる。Canonical

(Wnt/ β -catenin)経路では、WntとFrizzledや共受容体Lrp5/6との相互作用が、核内で転写の調節因子として働く β -cateninの安定化をもたらす (Kawano and Kypta, 2003; Kelly et al., 2004)。一方、non-canonical経路には、Rho GTPaseを活性化するPlanar Cell Polarity (PCP) 経路、もしくは、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、PKCとCamKIIを活性化するカルシウム (Ca²⁺) 経路が知られている (Kühl, 2002)。

脊椎動物の胚発生におけるWntの機能は、変異マウス作製、アフリカツメガエル、ニワトリ、ゼブラフィッシュを用いたノックダウンや過剰発現実験によって明らかにされてきた。これらによって、Wnt/ β -catenin経路は、原条の形成 (Liu et al., 1999)、尾のオーガナイザー形成 (Agathon et al., 2003)、体節形成 (Takada et al., 1994; Aulehla et al., 2003) などに必須であると予想されている。一方、

non-canonical/PCP経路と構成因子は、その変異が、ショウジョウバエにおいて翅や眼の細胞極性の異常を引き起こすことを元に、最初に同定された。その後、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュでの解析により、PCP経路が体軸伸長、神経管閉鎖に関連する中胚葉の収斂伸長運動を調節することが明らかにされた (Torban et al., 2004)。マウスでは、PCP構成因子である*Celsr1* (*Flaming*のマウス相同遺伝子)、*Scrb1* (*Scribble*のマウス相同遺伝子)、*Vangl2* (*Van Goph/Strabismus*のマウス相同遺伝子)の変異体が神経管の閉鎖不全を示す (Curtin et al., 2003; Murdoch et al., 2003)。最近の研究では、*Dvl1*、*Dvl2*の二重ホモ変異胚と*Loop-tail (Lp)*マウス (*Vangl2*遺伝子変異体)の解析により、マウスでもPCP経路が中胚葉の収斂伸長を調節することが確かめられている (Wang et al., 2006)。

Wntシグナルは、*Dkk*、*Wise*、*Wif*、*Sfrp*などの分泌性阻害因子で調節される (Kawano and Kypta, 2003; Yamaguchi 2001)。*Dkk* (*Dickkopf*)と*Wise* (*Wnt modulator in surface ectoderm*)は、共受容体*Lrp5/Lrp6*と相互作用することで、リガンドと受容体の複合体形成を阻害する (Semenov et al., 2001; Itasaki et al., 2003)。*Sfrp* (*Secreted frizzled-related protein*)と*Wif* (*Wnt inhibiting factor*)は、Wntリガンドに結合する*Frizzled*の*Cysteine-Rich Domain (CRD)*に相同性の高い領域を持ち、リガンドに直接結合することでシグナルを阻害すると予想される (Hsieh et al., 1999; Kawano and Kypta, 2003)。リガンドレベルの阻害は、組織におけるWntリガンドの活性と濃度勾配形成の調節を可能にする。これまでに、分泌性阻害因子によるWntシグナルの調節が、頭部形成に関連することが報告されている。特に、*Dkk1*によるWntシグナル阻害は頭部前方の誘導と肢のパターン形成に必要であることが明らかにされた (Mukhopadhyay et al., 2001)。また、アフリカツメガエルにおける過剰発現の実験から、原口背唇部における*Dkk1*と*FrzB* (*Sfrps*のメンバー)のWnt阻害が頭部オーガナイザーの活性に必要であることが推定された (Glinka et al., 1997; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Niehrs, 1999)。

ヒトとマウスにおいて、*Sfrp*ファミリーには5種類の関連遺伝子が同定され (Kawano and Kypta, 2003)、これらは、*Sfrp1*と*FrzB*のサブファミリーに分けられる。一方、*Crescent*と*Sizzled*は、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、ニワトリでのみ、同定されている。*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*は、アミノ酸配列の相同性が高く (Jones and Jomary, 2002)、分子系統樹上で同じサブファミリーに属する (以後、単に*Sfrps*)。In vitroの解析から、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*の機能は、 β -cateninのレベルを減少させ、*Myc*などの下流標的遺伝子の発現を低下させるなど、Wnt/ β -catenin経路を抑制することが示された (Suzuki et al., 2004)。また、マウス*Sfrp1*と*Sfrp5*のゼブラフィッシュ相同分子種である*Tlc*は、終脳の形成過程でWnt8bを阻害する (Houart et al., 2002)。実際、*Sfrp1*は、*Xwnt8*、*Wnt1*、*Wnt2*と

相互作用することが、アフリカツメガエルの実験などから示唆されている (Xu et al., 1998; Dennis et al., 1999)。さらに、*Sfrp1*は、*Wnt7b*と相互作用してnon-canonical経路を阻害し、神経軸索の伸長誘導を抑制する (Rosso et al., 2005)。この様に、*in vitro*の解析から、*Sfrps*がcanonical経路、non-canonical経路の活性を調節することが予想されたが、私の研究に至るまで、生体内における機能はほとんど解明されていなかった。

本研究では、胚発生における機能を明らかにするために、*Sfrps*遺伝子の多重変異体マウスを作製し、特に、*Sfrps*がどのようにWntシグナルを調節するかについて遺伝学的解析を行った。その結果、*Sfrps*サブファミリー間で機能が相補されること、これらが協働してPCP経路、*Wnt/β-catenin*経路を調節しており、これによって、頭尾体軸伸長と体節形成を制御することが明らかになった。

材料と方法

Sfrp1 遺伝子の変異体マウスの作製

Sfrp1 変異体マウスを作製するために、*LacZ* 遺伝子ノックインベクターを作成した。このベクターと、内在遺伝子座との相同組み換えによって、*Sfrp1* 遺伝子の翻訳開始点より 5'上流から第一エクソンの 3'末端までが核局在シグナルの付いた *LacZ* 遺伝子に置換される。まず、*Sfrp1* 遺伝子座を含む C57BL/6 BAC クローン (RPC123-40G24) から第一エクソンを含む 13.7kb の *Bam*HI DNA 断片をサブクローニングした。5'アームとして翻訳開始点のやや 5'上流に位置する 1.4kb の *Bam*HI-*Sac*II DNA 断片と 3'アームとして第一エクソンより 3'側の 5.3kb の *Eag*I-*Nhe*I DNA 断片を切り出し、これらを *IRES-T-lacZ-Neo* カセットに繋いだ。相同組換え体 ES 細胞を効率的に選別するために、5'側にジフテリア毒素遺伝子の配列を含む MC1-*DtpA* (Yagi et al., 1993) を付加した。構築したノックインベクターは、相同領域の外側にある *Xho*I で直鎖状にし、25 μg を AB1 ES 細胞 (McMahon and Bradley, 1999) にエレクトロポレーションにて導入した。その後、G418 (250 μg/ml) 存在下で培養し、G418 耐性 ES 細胞株 648 株を得た。得られた ES 細胞株について、サザンハイブリダイゼーションを用いて、相同組み換え体 ES 細胞株を選別した。プローブは、組み換え部位外側の 5'側と 3'側断片を鋳型として作成した。ES 細胞より抽出した DNA を *Asp*718 で切断した場合、5'プローブにより検出される DNA 断片の長さは、野生型では 11.0kb、変異型では 8.0kb であった。一方、3'プローブには、*Bam*HI による消化が必要で、これにより検出される DNA 断片の長さは、野生型では 14.0kb、変異型では 11.0kb であっ

た。同定されたノックイン ES 細胞株 3 株を C57/BL/6 系列マウスの胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。2 株について生殖系列に変異が移行したマウスを得ることが出来た。これらのキメラマウスを C57/BL/6 の雌と交配させ、ヘテロ接合型変異体マウスを得た。そして、ヘテロ型変異体マウス同士を交配し、ホモ型変異体マウスを獲得した。遺伝子型の同定は、尾から抽出した DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションと PCR 法によって行った。サザンハイブリダイゼーションでは、抽出した DNA を *Bam*HI で消化し、検出には 3'プローブを用いた。また、第二世代以降の遺伝子型は PCR 法で同定した。PCR プライマーについては、野生型には *IRES-T-lacZ-Neo* カセット挿入部位の 5'上流に共通プライマー *Sac*II f (5'-GATTGGTAACTGCGCGGCTG-3')と第一エクソン内に *Sac*II r (5'-GACTGGAAGCTCACGTAGTCG-3')を設定し、増幅される DNA 断片の長さは 510bp であった。また、変異体型には *Sac*II f とカセット内に *IRESr2*(5'-GGGCCCTCACATTGCCAAAAG-3')を設定し、増幅される DNA 断片の長さは 420bp であった。

***Sfrp2* 遺伝子の変異体マウスの作製**

Sfrp2 遺伝子への変異導入は、相同組み換えによって第一エクソンが PGKneobpAloxB 陽性選別マーカーカセット (*PGK* 遺伝子プロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、ウシ成長ホルモンのポリ A を 2 つの loxP で挟んだカセット) に置換されるように行った。相同組み換えベクターの作成に当たり、まず、*Sfrp2* 遺伝子座を含む C57BL/6 BAC クローン(RPCI23-374N17)から 14.0kb の *Bam*HI DNA 断片をサブクロニングした。この *Bam*HI DNA 断片から 5'アームとして 2.0kb の *Asp*718-*Eco*RI DNA 断片と 3'アームとして 6.5kb の *Eco*RV-*Bam*HI DNA 断片を切り出した。PGKneobpAloxB 陽性選別マーカーカセットを逆向きに挿入し、3'側に MC1-*DtpA* カセットを付加した。構築した *Sfrp2* 相同組み換え用ベクターは *Asp*718 で直鎖状にした。*Sfrp1* 遺伝子座の相同組換えと同様の手法により、G418 耐性 ES 細胞株 249 株を得た。サザンハイブリダイゼーションによる選別では、ES 細胞より抽出した DNA を *Bam*HI で処理した。プローブは、組み換え部位外側の 5'側と 3'側 DNA 断片を鋳型として作成した。5'プローブにより検出される DNA 断片の長さは、野生型では 14.0kb、変異型では 6.0kb であった。3'プローブにより検出される DNA 断片の大きさは、野生型では 12.0kb、変異型では 10.0kb であった。3 株の相同組み換え ES 細胞株を同定し、そのうち 1 株について生殖系列へ移行したキメラマウスを得た。キメラマウスから得た仔の遺伝子型同定は、尾より抽出した DNA について、5'プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより行った。*Sfrp2* 遺伝子型を同定するための PCR プライマ

ーについては、野生型には *PGK neo* カセット挿入部位の 5' 上流に共通プライマー *2gf1* (5'-CACGAGTAGTGAATACCTGAG-3') と変異体型では欠失する領域内に *2gr1* (5'-GATCAATTCTCTAGAGCTCGC-3') を設定し、増幅される DNA 断片の長さは 480bp であった。変異体型には *2gf1* とカセット内に *bpAf* (5'-GACACATTGTTGCTGCTTCCT-3') を設定し、増幅される DNA 断片の長さは 350bp であった。

***Sfrp5* 遺伝子の変異マウス作製**

Sfrp5 遺伝子への変異導入は、相同組み換えベクターの *PGKneobpAloxA* を含む配列を、第一エクソンに置換挿入させることで行った。相同組み換えベクターの作成に当たり、まず、*Sfrp5* 遺伝子座を含む C57BL/6 BAC クローン (RPC122-38H13) から 13.2kb の *Asp718* DNA 断片をサブクローニングした。5' 側の 5.2kb の *HindIII-SmaI* DNA 断片と 3' 側の 3.9kb の *SpeI-EcoRI* DNA 断片で *PGKneobpAloxA* を含むカセットを挟んで結合させた。カセットは、*neo* に *IRES* (internal ribosomal entry sequence)、変異の入った *YFP* (yellow fluorescent protein sequence)、*IRES* と結合時のフレームシフト変異で、翻訳領域に多量の休止コドンを生じ (Nagai et al., 2002)、*SV40* ポリ A 付加配列 (*SV*) を繋ぎ、転写と翻訳が完全に終結するようにした。また、相同組換え ES 細胞株を効率的に選別するため、5' 側に *MC1-DtpA* 陰性選別カセットを付加した。構築したベクターは *ClaI* で直鎖状にした。*Sfrp1* 遺伝子座の相同組換えと同様の手法により、285 株の G418 耐性 ES 細胞株を得た。*Asp718* で消化し、5' プローブと 3' プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで検出することで、正しい相同組み換え体 ES 細胞株を選別した。5' プローブにより、野生型 ES 細胞では 13.0kb、変異型では 6.5kb の DNA 断片が検出された。一方、3' プローブを用いた場合、野生型では 13.0kb、変異型では 9.0kb の DNA 断片が検出された。28 株の相同組み換え ES 細胞株を同定し、そのうち 2 株について生殖系列へ移行したキメラマウスを得た。マウスの遺伝子型の同定のためのサザンハイブリダイゼーションには、5' プローブを用いた。*Sfrp5* の遺伝子型を同定するための PCR プライマーは、野生型には共通プライマー *sfrp5fg* (5'-GAGAGACTGTGGTGGAGAGAG-3') と変異型では欠失する領域内の *sfrp5rg* (5'-CCGTAGTAGTCGTACTCCTGG-3') を設定し、増幅される DNA 断片は 540bp であった。変異体型には、*sfrp5fg* とカセット内の *IRESr2* (5'-GGGCCCTCACATTGCCAAAAG-3') を設定し、増幅される DNA 断片は 400bp であった。

***Lp* (Loop-tail) と *Dkk1* 遺伝子変異マウスの作製**

Lp マウスはジャクソン研究室 (LPT/Lej ストック)から購入した。遺伝子型同定のために、以下の配列を野生型と変異型それぞれの順向きプライマーとして使用した (野生型 : 5'-CAAACAGTGGACCTTGGTGAG-3'、変異型 : 5'-CAAACAGTGGACCTTGGTGAA-3')。以下の配列を共通の逆向きプライマーとした (5'-AAGAGGAAGTAGGACTGGCAG-3')。 *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスは *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスと *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{+/-};*Sfrp5*^{+/-}マウスの交配で作製した。また、 *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{+/-};*Sfrp5*^{+/-}マウスは、 *Lp*^{+/+}マウスと *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスの交配から得た。

Dkk1 ノックインマウスは、第一エクソンと第二エクソンを EYFP と SV40 ポリ A 付加配列に置換したもので、 *Dkk1* と *Sfrps* の多重変異体を得るための交配に使用した。この *Dkk1* 変異マウスのホモ変異胚が、胎齢 9.5 日において、以前の報告と同様の表現型を示すことを確認した (Mukhopadhyay et al., 2001)。 *Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚は *Dkk1*^{+/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}マウス同士の交配により作製した。 *Dkk1*^{+/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}マウスは *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}の雌と *Dkk1*^{+/-};*Sfrp1*^{-/-}の雄の交配から回収し、コロニーは *Sfrp1*^{-/-}マウスと掛け合わせることで維持した。 *Dkk1*^{+/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}マウスの出生数は、ほぼメンデルの法則に予想される割合で得られた (表 3)。

免疫染色

抗ニューロフィラメント抗体 (2H3) で全胚免疫染色するため、胚を 3.5% パラホルムアルデヒド (PFA) の入ったリン酸緩衝食塩水 (PBS) に 4°C で一晚固定した。固定した胚は 0.1% Tween-20 を含む PBS (PBT) を含むメタノールシリーズ (25、50、75、100%) に通して脱水し、逆に、順次 75、50、25、0% メタノールシリーズに置換することで水和した。次に、6% の H₂O₂ を含む PBT で処理し、0.1% Tween-20 を含むトリス緩衝食塩水 (TBST) で洗い、10% ヒツジ血清でブロッキングした。ブロッキングした胚は、2H3 モノクローナル抗ニューロフィラメント抗体 (溶液中 50 倍希釈) と 4°C で一晚反応させた。その後、HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (1000 倍希釈) と反応させた。免疫反応はジアミノベンジジンで検出した。また、二リン酸化 ERK に対する抗体染色は、以前の論文に従った (Corson et al., 2003)。

脱リン酸化 β -catenin を検出するための抗体染色用には、胚を 8% PFA を含む PBS で固定し、凍結切片は一般的なプロトコールに従って作成した。脱リン酸化 β -catenin に対する一次抗体 (Upstate; mouse monoclonal 8E4) は、5% スキムミルクを含む TBST 中において 400 倍の濃度で使用した。免疫反応は、Alexa488 結合抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) に 3% BSA の入った TBST で 200 倍

の濃度において行った。画像は Zeiss の Axiovert を装備した Biorad Radianc 2100 Laser Scanning Confocal Microscope System で取込み、Adobe Photoshop CS で処理した。

In situ hybridization

ジグオキシゲニン (DIG) で標識した RNA プローブを用いた in situ hybridization は、Wilkinson (1992) のプロトコールに従った。In situ hybridization 後の切片作成は、凍結試料により行った。Double whole-mount in situ hybridization は Wilkinson (1992) のプロトコールを参考に、以下のように改良した。異なる 2 種類 [Dig とフルオレセイン (FITC)] で標識したプローブを用いた。2 つの異なるプローブで同時に反応させた後、Dig で標識した RNA プローブをアルカリフォスファターゼ (AP) 結合抗 Dig 抗体で認識させ、NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) /BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) 液で発色させた。その後、初めに検出させた抗体を除去するために 0.1% Tween-20 の入った 0.1M 塩化グリシンで処理した。2 回目の検出は、AP 結合抗 FITC 抗体で認識させ、INT[2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride]/BCIP 液による発色を行った。

Sfrp1 プローブは、cDNA サブトラクションスクリーニングから得られた cDNA 断片を使用した (Shimono and Behringer, 1999)。*Sfrp2*、*Sfrp5*、*Hoxa7* (BC036986)、*Hoxd10* (BC048690) cDNA は、IMAGE クローン (Invitrogen) として入手した。*Axin2* (AK08466644)、*Fgf17* (AK077555)、*Nkd1* (AK082367) cDNA は FANTOM クローン (FANTOM Consortium, Carninci P, et al., 2005) の中から得た。*Hoxb2* cDNA の 3'UTR を含む 1.5kbp 断片は 8.5 日胚の cDNA ライブラリーから分離した (大阪大学濱田博司先生より譲渡)。画像は Zeiss Stemi2000-C 立体顕微鏡を装備した Pixera Pro600ES デジタルカメラで取り込んだ。

DiI による細胞標識と全胚培養

マウス胚を 10% ウシ胎児血清入りの DMEM に回収した。細胞の標識を行っている間は、胚を M2 培地中に室温で保存した。平滑断端にした注入用ピペット (内径 40 μ m) 内に 3M スクロース水溶液で希釈した DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) を用意した。保持用ピペット (内径 40 μ m) で胚を固定し、DiI 溶液を尾芽近傍の原条にあて、約 10 秒間、標識した。標識後、胚を M2 培地で一回洗い、3ml の 50% ラット血清を含む DMEM の入った 50ml チューブに移し、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ の混合気体で満たした。中胚葉の細胞が標識されたことは、切片作成によって確認し

た。一方、内胚葉や神経板内の標識された細胞は、短時間では広がらなかった。標識した胚は、2時間培養後、Leica MZFLIII 蛍光顕微鏡を装備した Zeiss AxioCam HRc デジタルカメラで画像として記録した。さらに、22 時間培養を行い、標識した細胞が未分節中胚葉 (PSM) であることを確認し、PSM の細胞が標識された胚をデータとして採用した (n)。

尾芽の培養と *in situ hybridization*

マウス胚を 10%FCS 入り PBS に取り出し、新しく形成された体節より数体節頭側で切り離した。尾側の切断片を神経管の正中線に沿って縦に、2 つに切断した。片方の断片は、すぐに 4%PFA に 4°C で固定した。もう一方の断片は、10ng/mlFGF-2、10%FCS 入りの Ham's F-12 : DMEM が 1 : 1 の培地を 40 μ l のハンギングドロップの形にし、そこで 37°C、5%CO₂ の条件で培養した。一定の時間培養した後、4°C で固定した。以後、上記の *in situ hybridization* と同じ条件で処理した。

結果

Sfrp1 と *Sfrp2* の変異体マウスの作製

Sfrp1 と *Sfrp2* の変異体マウスを作製するために、*Sfrp1* と *Sfrp2* の遺伝子座の最初のメチオニンと CRD をコードする第一エクソンに変異を導入した。*Sfrp1* ノックイン変異体マウスでは、ES 細胞内で *Sfrp1* 遺伝子座の第一エクソンを核局在 *lacZ* カセットに置換した (図 1 A、B)。同様に、*Sfrp2* 遺伝子座の第一エクソンを PGKneobpAloxB カセット (Shimono and Behringer, 2003) に置換した (図 1 D、E)。それぞれ雄の生殖系列キメラマウスを C57BL/6 雌マウスと交配して、ヘテロ接合型マウスを得た。この 129 系統と C57BL/6 系統が混合したヘテロ接合型マウス同士を交配させ、ホモ接合型マウスを作製した。仔の遺伝子型はザンハイブリダイゼーションと PCR 法により同定した。*Sfrp1* 遺伝子座にホモ接合型変異を持つマウス (*Sfrp1*^{-/-}) では、胚発生の過程に目立った異常は観察されなかった (図 1 C、表 1 A) (Bodine et al., 2004)。同様に、*Sfrp2* 遺伝子座にホモ接合型変異を持つマウス (*Sfrp2*^{-/-}) では、低頻度で後肢に合肢症が示された (3% ; 62 匹中 2 匹) が、発生過程において、調べた範囲で異常は観察されなかった (図 1 F、表 1 A)。欠損した *Sfrp1* と *Sfrp2* の第一エクソンには、最初のメチオニンと機能ドメイン (CRD) をコードする領域が含まれる。従って、*Sfrp1* と *Sfrp2* の変異体マウスは、ヌル変異体と判断した。また、変異が導入された遺

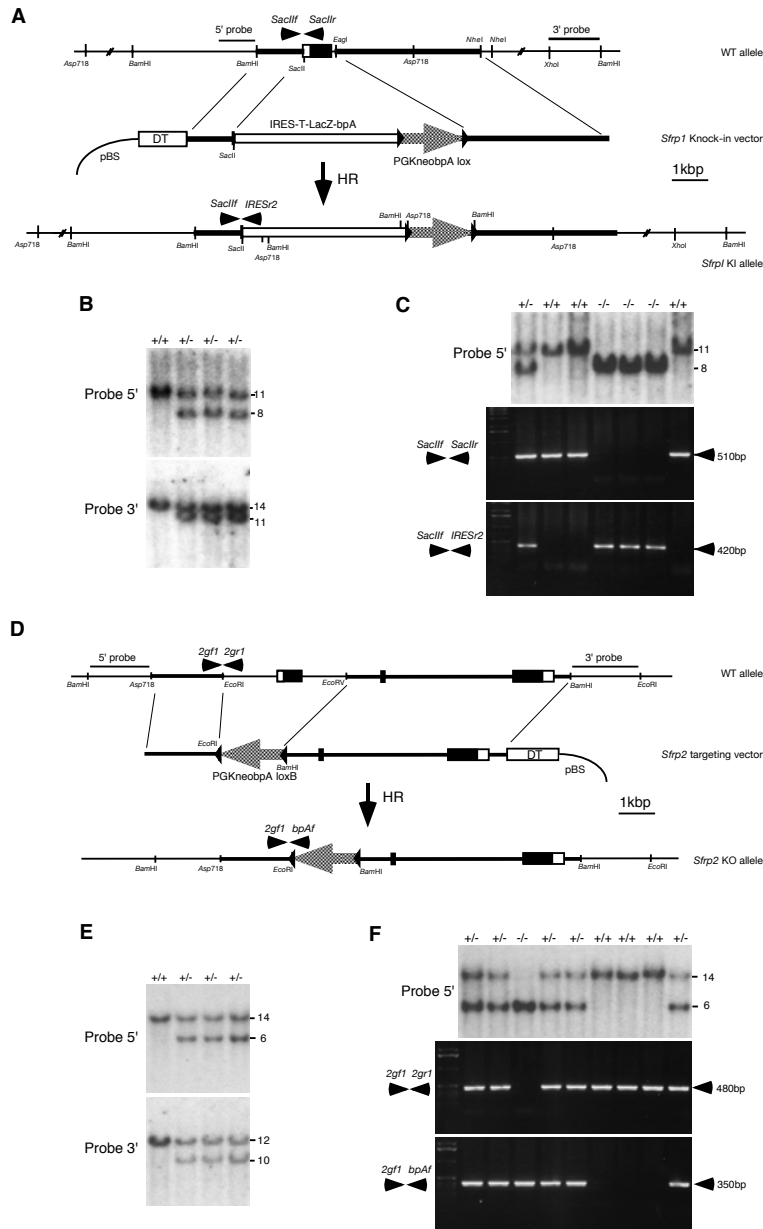


図1、Sfrp1とSfrp2の変異体マウスの作製。

(A) Sfrp1の相同遺伝子組み換え。5'側の1.4kbのBamHI-SacII断片と3'側の5.3kbのEagI-NheI断片をLacZノックインカセットに繋いだ。LacZノックインカセットは、pNTR T-lacZ (IRES、核局在lacZの翻訳領域、SV40ポリA付加配列を含む)とPGKneobpAlox (PGKプロモーターで促進されるネオマイシン耐性遺伝子とウシ成長ホルモンのポリA付加配列を2個のloxP配列で挟んだ配列)から構成される。相同組み換え体の濃縮のため、MC1DtpA (DT)を5'側に付加した。黒い三角形はloxP部位の位置と方向を表す。

(B) 野生型とSfrp1ノックインES細胞株から抽出したDNAのサザンブロット解析。(上)5'プローブによるAsp718処理DNA断片の検出。11.0kbの断片は野生型を示し、8.0kbの断片は変異体型を表す。(下)3'プローブによるBamHI処理DNA断片の検出。14.0kbと11.0kbの断片は、それぞれ、野生型と変異体型を示す。

(C) ヘテロ接合体同士の交配から得られた仔の尾から抽出したDNAのサザンブロット(上)とPCR(下)解析。(上)5'プローブによるAsp718処理DNA断片の検出。(下) SacII f/SacII rのプライマーの組み合わせによるPCR。510bpの野生型特異的なDNA断片が増幅される。SacII f-IRESr2のプライマーの組み合わせによるPCR。420bpの変異体型特異的なDNA断片が増幅される。プライマー(SacII f、SacII r、IRESr2)の位置はAに示す。

(D) Sfrp2の相同遺伝子組み換え。5'側の2.0kbのAsp718-EcoRI断片と3'側の6.5kbのEcoRI-BamHI断片をPGKneobpAlox B選別マーカー(PGKプロモーターで促進されるネオマイシン耐性遺伝子とウシ成長ホルモンのポリA付加配列を2個のloxP配列で挟んだ配列)に繋いだ。MC1DtpA (DT)を3'側に付加した。黒い三角形はloxP部位の位置と方向を表す。

(E) 野生型とSfrp2ターゲティングES細胞株から抽出したDNAのサザンブロット解析。(上)5'プローブによるBamHI処理DNA断片の検出。14.0kbの断片は野生型を示し、6.0kbの断片は変異体型型を表す。(下)3'プローブによるEcoRI処理DNA断片。12.0kbと10.0kbの断片は野生型と変異体型を示す。

(F) ヘテロ接合体同士の交配から得られた仔の尻尾から抽出したDNAのサザンブロット(上)とPCR(下)解析。(上)5'プローブによるBamHI処理DNA断片の検出。(下) 2gf1/2gr1のプライマーの組み合わせによるPCR。480bpの野生型特異的な断片が増幅される。2gf1-bpAfのプライマーの組み合わせによるPCR。350bpの変異体特異的な断片が増幅する。プライマー(2gf1、2gr1、bpAf)の位置はDに示す。Sfrp1とSfrp2のエクソンの5'末端と3'末端はデータベースの情報に基づいて作成されている。pBS、pBluescript KS-

表 1、*Sfrp1* と *Sfrp1* の機能的相補

A、離乳後の出生児の遺伝子型 (%)

両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{+/+}	<i>Sfrp1</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-}	合計	
<i>Sfrp1</i> ^{+/-} x <i>Sfrp1</i> ^{+/-}	61 (21)	161 (56)	66(23)	288 (100)	
両親の遺伝子型	<i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Sfrp2</i> ^{+/-}	<i>Sfrp2</i> ^{-/-}	合計	
<i>Sfrp2</i> ^{+/-} x <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	12 (15)	45 (58)	21(27)	78 (100)	
両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Sfrp1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	合計
<i>Sfrp1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} x <i>Sfrp1</i> ^{-/-}	27(25)	28(26)	28(26)	24(22)	107 (100)

B、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}-マウス同士の交配によって得られた胚もしくは仔の遺伝子型[%]

胚 期	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{-/-}	合 計
E8.5	51[24]	96[45]	68*[32]	215(1†)
E9.5	37[31]	51[43]	31*[26]	119(2†)
E10.5	17[27]	30[48]	16*[25]	63(6†)
E14.5	2	2	1*	5
E15.5	2	2	1*	5
E16.5	4	15	9*(1*†)	28(2†)
E14.5~16.5	8[21]	19[50]	11*[29]	38
E17.5	1	5	0	6(3†)
E18.5	5	11	(1*†)	17(1†)
E17.5~18.5	6[27]	16[73]	0[0]	22
離乳後	16[38]	26[62]	0[1]	42

†, 吸収胚

*, 異常な形態を示す胚

伝子座からの転写は検出されなかった。

***Sfrp1* と *Sfrp2* は機能的に重複する**

胚発生における発現領域の類似性から、*Sfrp1* と *Sfrp2* が機能的に重複することを予想した (図 1 2 A-D、E-)。*Sfrp1* と *Sfrp2* の発現は、胎齢 8.5 日から 9.5 日において前脳、中脳、後脳、尾側の神経板/管で重複して観察された (図 1 2 C、D、F、G ; Leimeister et al., 1998)。また、未分節中胚葉 (PSM) における重複した発現も報告されている (Lee et al., 2000)。そこで、*Sfrp1* と *Sfrp2* の二重ホモ変異 (*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}) 胚を作製するために、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} マウス同士を交配させた。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} の仔が新生仔中に存在しないことは、出生前に致死することを示唆した (表 1 B)。このことから、*Sfrp1* と *Sfrp2* は機能的に重複することが予想された。

***Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚は胸部領域の短縮を示す**

胎齢 16.5 日付近で致死となった *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚は、浮腫状、頭蓋顔面異常、四肢伸長異常、多指を示していた (図 2 A-E、表 1 B)。中でも、四肢伸長異常は、活性化 β -catenin の恒常的な強制発現、Wnt の過剰発現、Wnt5a の不活性化等のように Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させた際に見られる典型的な表現型である (Topol et al., 2003; Guo et al., 2004)。多指は、右の後肢前部で頻繁に観察され (50%、n=16)、左の後肢でも稀に見られた (図 2 F-I)。この表現型は、10.5 日胚の後肢芽腹側表面における余剰な縞状の *Fgf8* 発現に一致した (図 2 J、K)。この観察は、四肢形成期の外胚葉性頂堤 (AER) では、異所的な *Fgf8* の発現が Wnt/ β -catenin のシグナルを調節するとの報告に合致する (Mukhopaghyay et al., 2001; Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003)。また、10.5 日胚における *Sfrp1* は後肢芽基部を含む腹側体壁、*Sfrp2* は四肢の間充織組織で発現する (Leimeister et al., 1998)。

Sfrp1^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚の前脳、中脳、後脳のパターン形成は、胎齢 9.5 日から 10.5 日でほぼ正常に観察された。*Sfrp1* と *Sfrp2* の発現は、後脳で強度に検出される (図 1 2 C、D、F、G) (Leimeister et al., 1998) が、菱脳 3 番と 5 番における *Krox20* の転写と抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体の免疫染色のパターンを観察した限りにおいて、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚の菱脳パターン化は正常と思われた。

胎齢 14.5 日から 16.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚では、全体的形態において頭尾体軸の短縮が観察された (図 2 A)。また、軟骨組織染色からは、胸部領域が短小化し、胸椎の数が 13 個から 5 個に減少していることが明らかとなった (図 2 B-E)。これらのことは、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚における胸部領域の頭尾軸形成の異常が、頭

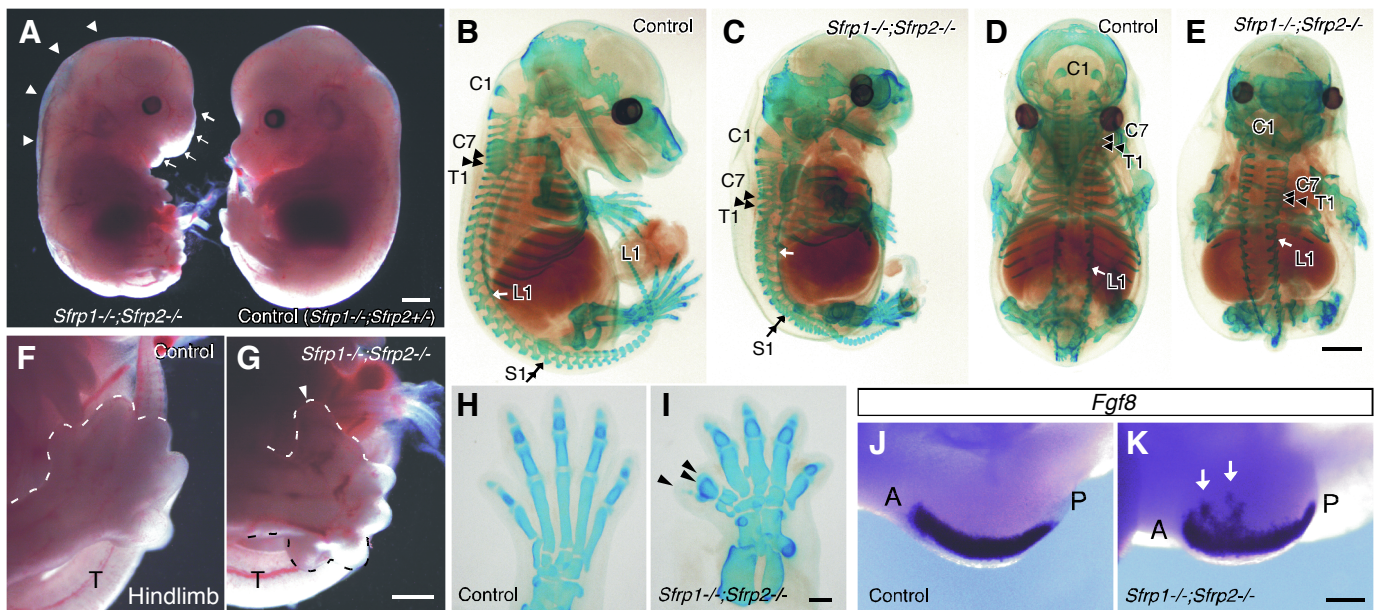


図2、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚は胸部領域の短小化と四肢の形態形成の異常を示す。
 (A) 胎齢14.5日の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚(左)とコントロール胚(右)の全体の形態。矢印は頭蓋顔面の異常を示す; 矢じりは浮腫の状態を示す。スケールバー: 1mm。
 (B-E) 胎齢15.5日のコントロール胚(B, D)と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚(C, E)での軟骨染色。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚での胸椎数が減少した。腰部と仙骨部での椎骨の数は正常であった。矢じり、C7椎骨; 二重矢じり、T1椎骨; 矢印、L1椎骨; 二重矢印、S1椎骨; C1、環椎。スケールバー: 1mm。
 (F-I) 胎齢14.5日における*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚(G)の後肢の多指(矢じり)と胎齢15.5日のコントロール胚(H)と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚(I)での軟骨のパターン。T、尻尾。スケールバー: F, Gは500 μ m; H, Iは200 μ m。
 (J, K) 胎齢10.5日のコントロール胚(J)と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚(K)の肢芽における*Fgf8*の発現。矢印は、後肢芽の腹側表面での過剰なシグナルを示す。A、前側。P、後側。スケールバー: 400 μ m。

尾体軸の伸長と体節の分節化異常に起因することを示唆した。そこで、体軸形成の異常を観察するために、9.25 から 10.5 日胚における以下の *Hox* 遺伝子発現を調べた。頭側の発現境界が菱脳 3 番に位置する *Hoxb2* (Rossel and Capecchi, 1999)、頭側の境界が体節 13 番目に存在する *Hoxa7* (Li and Shiota, 1999)、体節 27 番目まで発現する *Hoxd10* (Hérault et al., 1998) の 3 つの *Hox* 遺伝子について解析を行った。*Hoxb2* は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚においてコントロール胚 (野生型、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/+}) と同様に菱脳 3 番から尾側で発現した (図 3 A、B)。*Hoxa7* 発現の頭側境界は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚でもコントロール胚と同様に体節 13 番目付近に位置した (図 3 C、D)。しかし、*Hoxd10* の発現は、*Myogenin* の発現を指標に double whole-mount in situ hybridization (図 3 E-H) を行なうと、胎齢 10.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における発現境界が、体節 21 番目まで頭側に移動していた (図 3 E、F) (Edmondson and Olson, 1989)。以上の観察から、胸椎の形成に寄与する 11 番目から 23 番目の体節の融合、または、減少を示唆すると考えた (図 3 I)。

Sfrp1^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における体節形成

胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の形態と組織学的解析から、体節の分節化が不規則で不完全になることが明らかになった (図 4 A-D)。また、抗ニューロフィラメント抗体の免疫染色によって 10.5 日胚の体幹部中心付近における、分節構造を反映する神経繊維の走行パターンの不整が観察された (図 4 E、F) (Dodd et al., 1988)。組織解析からは、前肢後肢間領域である体節 11 番目以降で分節化が不規則になることが示唆された (図 4 C、D)。このことは、(分節化開始と同時に体節で発現し、硬節の尾側半分へと発現が制限されていく) *Mox1* (図 5 A-D) (Candia et al., 1992) と (真皮節の分化マーカーである) *Pax3* (図 5 E-H) (Goulding et al., 1991) の発現解析によっても確認された。前肢付近と同様に後肢近辺の領域では、小さいながらも規則的な体節が形成された。この観察は、後肢より尾側において体節の分節化が回復することを意味した (図 4、5)。一方、硬節の分化マーカーである *Uncx4.1* と *Pax1* の発現から、前肢後肢間領域の体節では前後軸の性質が維持されるようであった (図 5 I-K) (Mansouri et al., 1997; Neubuser et al., 1995)。*Myogenin* の発現解析から、筋節の分化は胎齢 9.5 日で遅延する (図 5 L-N) と推定したが、いずれの結果も、分節化不整が起きる体節でも細胞分化が生じることを意味していた。興味深いことに、胎齢 10.5 日の *Myogenin* の発現から、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における前肢後肢間領域の体節数が減少することは明確であった (*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/+}胚または *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}胚では、体節数が 17 個、*n*=3; *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、体節数が 13 個、*n*=3; 図 5 R-T) (Edmondson and Olson,

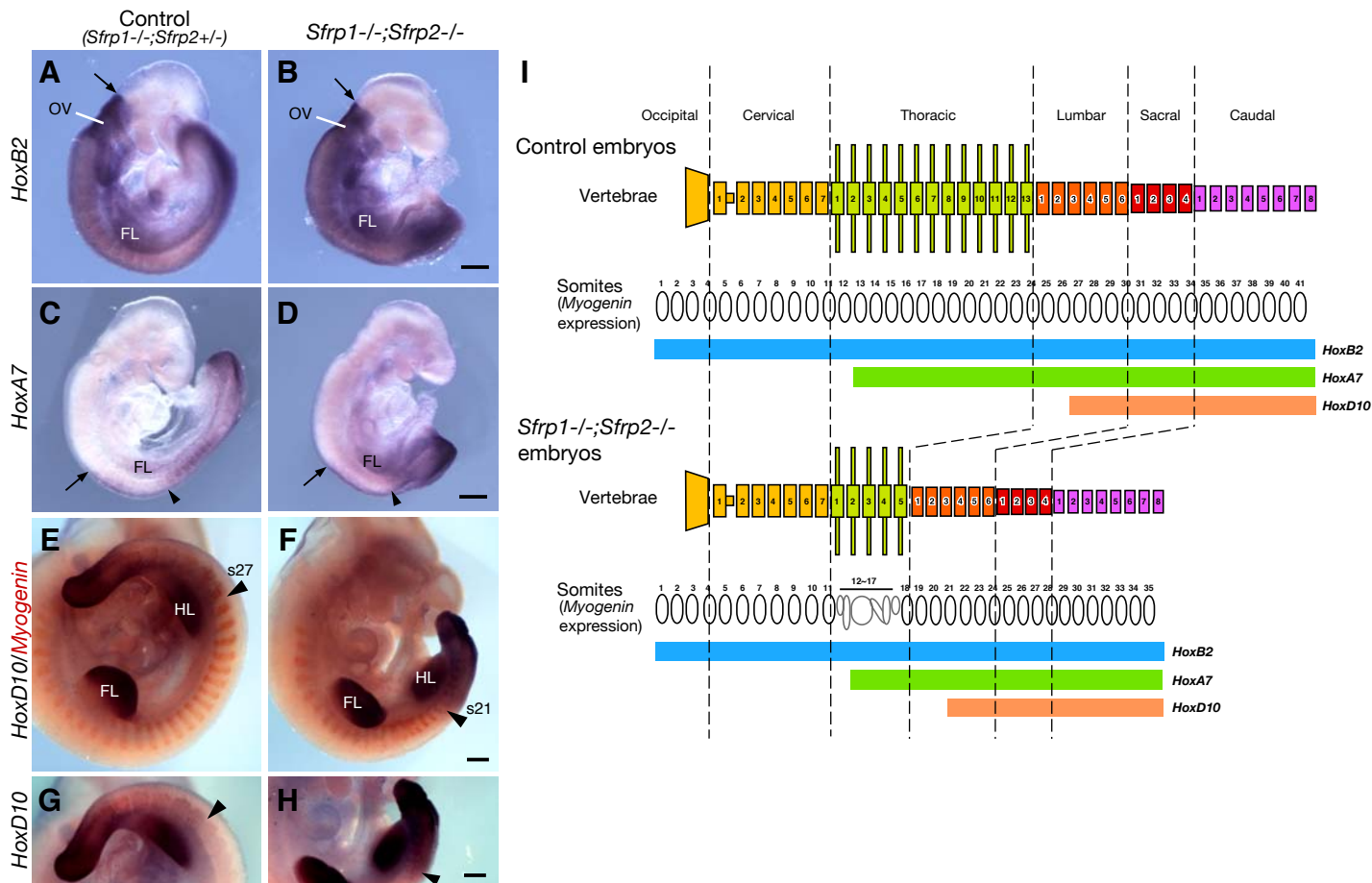


図3、Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚におけるHox遺伝子の発現。

(A、B) 胎齢9.25日のコントロール胚 (A) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (B) でのHoxb2の発現。矢印は、菱脳3番におけるHoxb2発現の前側の境界を示す。ov、耳胞。

(C、D) 胎齢9.25日のコントロール胚 (C) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (D) でのHoxa7の発現。矢印と矢じりは、それぞれ脊髄と体節におけるHoxa7発現の頭側の境界を示す。

(E-H) 胎齢10.5日のコントロール胚 (E、G) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (F、H) でのHoxd10とMyogeninの発現。Myogeninの発現はdouble in situ hybridizationでINT/BCIP液により染色した (赤色)。矢じりは、体節におけるHoxd10発現の前側の境界を示す。

(I) コントロール胚とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚における軟骨のパターンとHoxb2、Hoxa7、Hoxd10発現の概要。椎骨と体節数 (12-17) の相関関係は、Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚でのmyogeninの発現から評価した (E、F)。FL、前肢；HL、後肢。

スケールバー：250 μm。

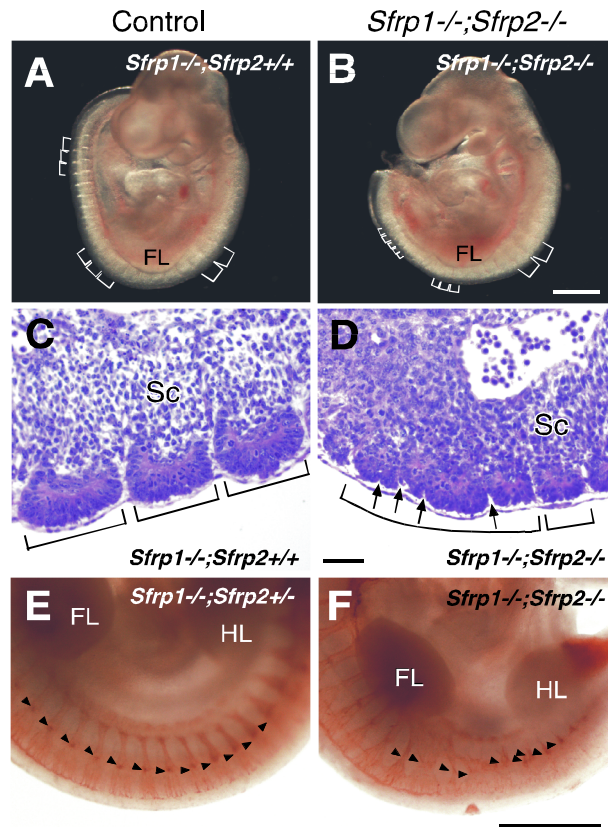


図4、Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚における体節の分節化異常。

(A、B) 胎齢9.5日のコントロール胚 (Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{+/+}; A) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (B) の全体的形態。体節の大きさは角括弧で示す。Sfrp1とSfrp2の不活性化によって尾側領域が短小化した。スケールバー：500 μm。

(C、D) 体節の分節化がSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚で異常となった。胎齢9.5日のコントロール胚 (C) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (D) の体節の分節化は、傍矢状切片を作成し、ヘマトキシレンとエオシンで染色して観察した。コントロール胚において規則的で同程度の大きさの体節 (角括弧) が観察される一方で、Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚の前肢後肢間の領域において不完全な体節 (角括弧内の矢印) が観察された。スケールバー：50 μm。

(E、F) 胎齢10.5日のコントロール胚 (E) とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚 (F) における2H3モノクローナル抗ニューロフィラメント抗体 (矢じり) による免疫染色。スケールバー：500 μm。FL、前肢；HL、後肢；Sc、硬節。

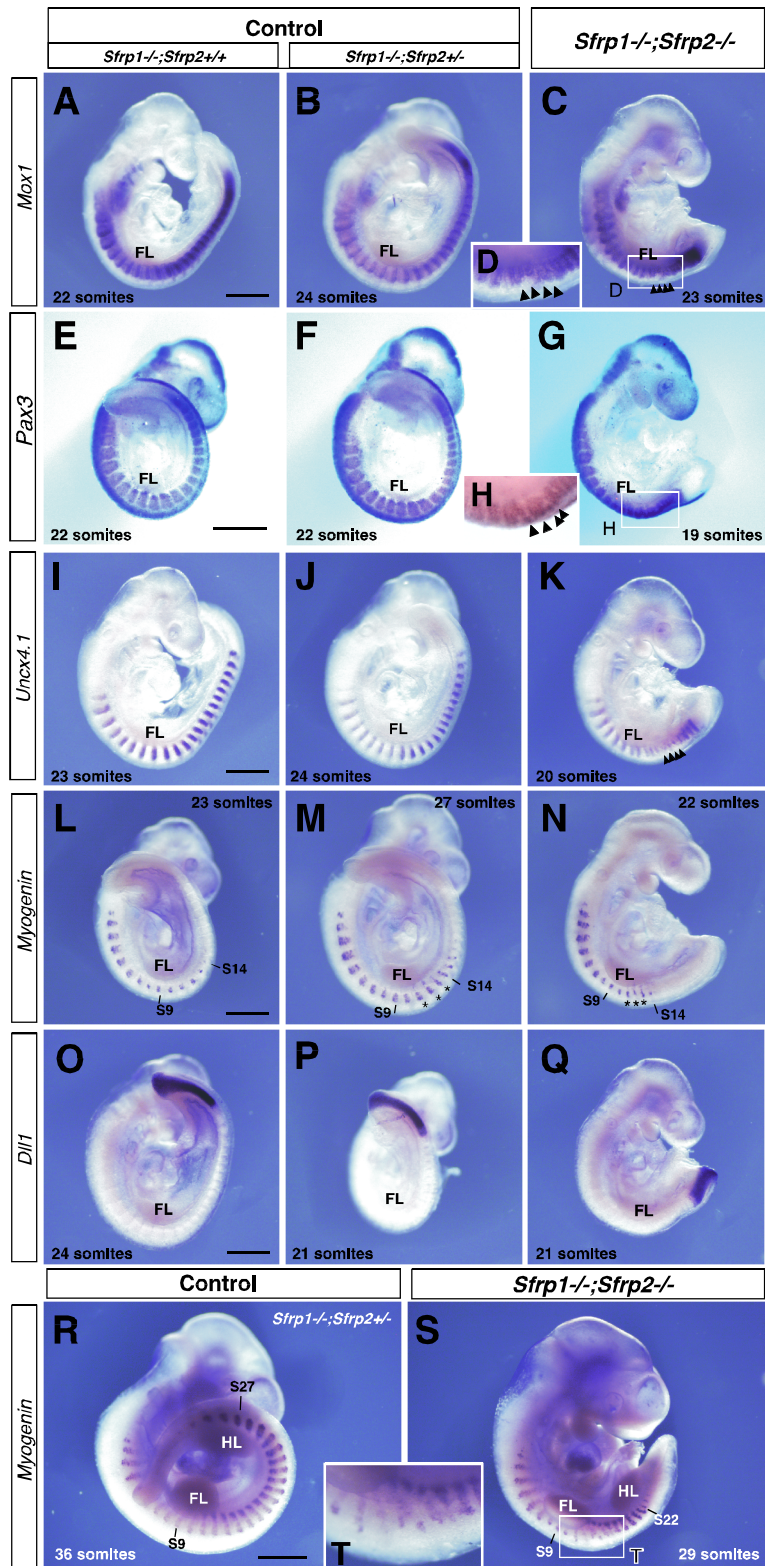


図5、*Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚の体節における分節化と細胞分化。

(A-N) *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚における前肢後肢間領域で体節の分節化が異常となった。(A-D) 胎齢9.5日のコントロール胚 (A, B) と *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚 (C) におけるMox1の発現。DはC内の四角で囲まれた部分の拡大図である。矢じりは、体節の不規則な分節化を示す。胎齢9.5日のコントロール胚 (E, F, I, J, L, M) と *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚 (G, H, K, N) におけるPax3 (E-H)、Uncx4.1 (I-K)、myogenin (L-N) の発現。HはG内の四角で囲まれた部分の拡大図である。矢じりは、体節の不規則な分節化を示す。星印は、コントロール胚 (M) の体節の位置に相当する *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚 (N) の体節の位置を示す。

(O-Q) コントロール胚 (O, P) と *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚 (Q) におけるD111の発現。 *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚のPSM領域に著しい影響が見られることに注目。

(R-T) コントロール胚 (R) と *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚 (S) におけるmyogeninの発現。 *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*胚の前肢後肢間領域の体節数が減少した。TはS内の四角で囲まれた部分の拡大図である。FL、前肢；HL、後肢。スケールバー：500 μ m。

1989)。また、胎齢 9.5 日の *Delta-like 1* (*Dll1*) 遺伝子の発現は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚における PSM 領域で減少を示した (図 5 O-Q) (Bettenhausen et al., 1995)。この観察に加え、前肢付近で小さい体節が形成されることを合わせると、より早い時期の尾側パターン形成に異常があることが推定された。尾側軸の短縮は、すでに 8.25 日胚で明らかであり、不規則で不完全な分節化が生じる前であると予想した。

***Sfrp1* と *Sfrp2* は胸部領域の頭尾体軸伸長に必要である**

Sfrp1^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚は、late head fold 期では、野生型やコントロール胚と区別できなかった。しかし、体節が形成され始める時期になると、尾側領域の中胚葉組織が肥厚し、コントロール胚との区別が可能となった (図 6 A-C、尾側領域のバー)。そこで、尾側体軸の伸長異常を解析するために、*brachyury* (*T*)、*Tbx6*、*Dll1* の発現を調べた。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚の *T* の発現から、初期の体節期 (3 体節期まで) で原条と中軸中胚葉 (結節と脊索) が正常に形成することが示唆された (図 6 A-C) (Wilkinson et al., 1990)。一方、胎齢 8.5 日の野生型とコントロール胚では、*Tbx6* と *Dll1* の発現は、PSM 領域 (図 6 D、E、G、H の矢印と矢じり間) と原条を含む沿軸中胚葉 (図 6 D、E、G、H のバーと矢印間) で観察された (Bettenhausen et al., 1995; Chapman et al., 1996)。一方、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚では、染色によるシグナルが高いレベルで原条両側の沿軸中胚葉において観察され (図 6 F、I のバーと矢印間)、頭側の発現領域の伸長が著しく減少していた (図 6 F、I の矢印と矢じり間)。6/7 と 11 体節期の *in situ hybridization* 後の胚の切片を作成し観察したところ、異常な *Dll1* の発現パターンは沿軸中胚葉の細胞の増加によることが明らかになった (図 6 K、L、N、O)。

さらに、胎齢 8.5 日付近の尾側体軸伸長異常の原因を同定するため、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚における細胞増殖率を検討した。抗リン酸化ヒストン H3 抗体 (Chadec et al., 1995) の染色によって得られた細胞増殖率は、6 体節期ではコントロール胚と比較して上昇していなかった (抗リン酸化ヒストン H3 抗体陽性細胞の増殖率は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/+} 胚では $7.36 \pm 1.30\%$ 、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚では $6.48 \pm 1.63\%$ であった ; n=3)。対照的に、11 体節期の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚における細胞増殖率は減少した (抗リン酸化ヒストン H3 抗体陽性細胞の増殖率は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/+} 胚では $7.83 \pm 0.73\%$ 、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚では $3.76 \pm 0.88\%$ であった ; n=3)。以上より、細胞増殖の減少は、より後期の尾側軸の減少に関連すると示唆される。しかし、中胚葉細胞の肥厚を伴った尾側体軸の減少は、細胞増殖率の低下が顕著になる以前の head fold 期で起きている。そこで、*Dll1* 発現細胞の蓄積は、頭尾軸に沿った中胚葉細胞の移動能の低下によると予想した。

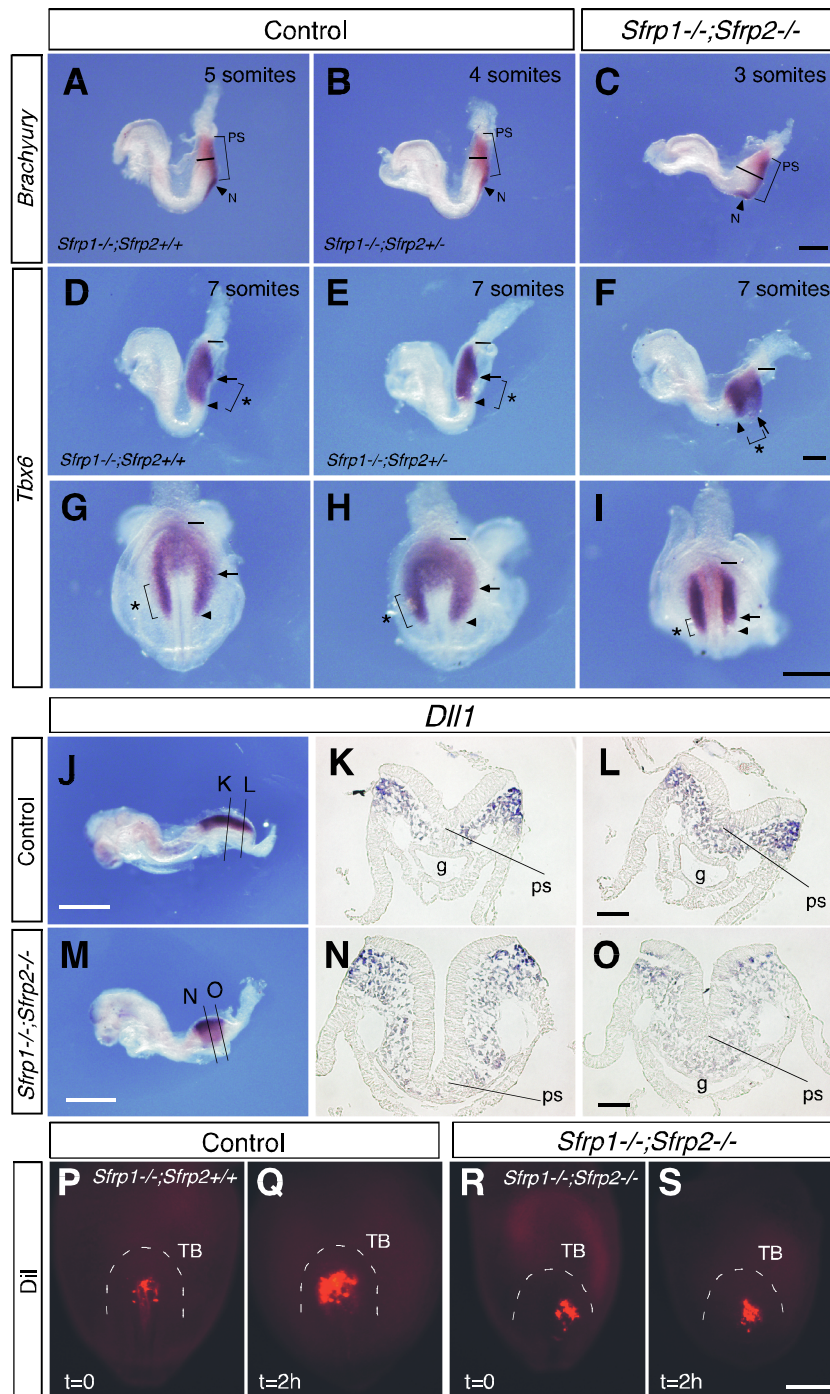


図6、胎齢8.5日の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における尾側体軸の伸長不全。

(A-C) コントロール胚 (A, B) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (C) におけるBrachyury (T) の発現。PS、原条；N、結節。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の尾側体軸の伸長異常は、最初に、体節の形成される時期になると中胚葉組織 (バー) の肥厚として観察される。スケールバー：250 μm。

(D-I) コントロール胚 (D, E, G, H) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (F, I) におけるTbx6の発現。D-F、側面図；G-I、後方図。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の原条の両側面で強度のシグナルが検出された。また、PSM領域 (星印) が著しく減少した。スケールバー；D-L：250 μm。

(J-O) 11体節期のコントロール胚 (J-L) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (M-O) におけるDII1の発現。K、L、N、Oは、J、Mで表す尾芽領域の横断面を示す。横断切片はin situ hybridizationを行った後に作成した。スケールバー：J、Mは500 μm；K、L、N、Oは50 μm。

(P-S) 数体節期のコントロール胚 (P, Q) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (R, S) における中胚葉細胞のDII標識実験。原条付近の中胚葉の細胞にDIIを注入した (t=0；P, R)。その後2時間培養した (t=2h；Q, S)。TB、尾芽。スケールバー：250 μm。

親油性色素 DiI で細胞を標識することにより細胞の移動を直接的に評価した。コントロール胚と *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の原条付近に位置する中胚葉組織に DiI を注入し、観察した。コントロール胚では、DiI で標識された中胚葉細胞が側面領域へ移動した (図 6 P、Q)、一方、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、その移動能が著しく減少した (図 6 R、S)。この観察は、*Sfrp1* と *Sfrp2* が沿軸中胚葉の細胞移動を調節することで尾側体軸の伸長に関連することを示唆する。

Wnt3a は尾芽で発現する (Yoshikawa et al., 1997)。Sfrp1 と Sfrp2 は Wnt シグナルに対し、阻害的に作用すると予想されるので、胎齢 8.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における Wnt シグナルの活性を検証した。Wnt/β-catenin 経路の活性化を評価するために、脱リン酸化を受けて安定化した β-catenin を、抗体染色により検出した。コントロール胚では、より強度な染色が後腸と原条直下にある中胚葉の細胞膜と核で観察された (図 7 A-C、G-I)。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、後腸と原条直下の中胚葉と同様な染色強度のシグナルが、尾芽領域の中胚葉と神経外胚葉において異所的に検出された (n=2; 図 7 D-F、J-O)。このことから、*Sfrp1* と *Sfrp2* の不活性化は Wnt シグナル活性を上昇させることが推定される。

***Sfrp1* と *Sfrp2* は PSM における Notch シグナル関連遺伝子の周期的発現に影響する**

Wnt3a と Fgf8 の濃度勾配は体節の分節境界の決定において必要である (Aulehla et al., 2003)。短小化した PSM における急な濃度勾配形成は、体節の矮小化を引き起こすと予想する。しかし、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚で見られる不整・不完全な分節化は、PSM が短小化したことだけでは説明できない。また、体節の分節化には、PSM における Notch シグナル関連遺伝子 *Lfng* と *Hes7* の周期的な発現も必要である (Saga and Takeda, 2001; Bessho et al., 2001)。*Wnt3a* は Notch 関連遺伝子の周期性発現に影響する (Aulehla et al., 2003)。そこで、まず、分節化不整が起こる時期と、規則的な体節の分節化が回復する時期について、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における *Wnt3a* の発現を調べた。不完全な分節化が生じる胎齢 8.5 日における *Wnt3a* の発現レベルは、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の尾芽領域において正常であった (図 8 A-C)。また、*Fgf8* の発現レベルも正常であった (図 8 J-L')。さらに、コントロール胚において抗二リン酸化 ERK 抗体染色で示される Fgf シグナルの活性 (Corson et al., 2003) は、PSM の頭側で減少したが (図 8 M、N)、同様の染色パターンは、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚でも観察された (図 8 O)。ところが、*Wnt3a* の発現レベルは、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚において、体節の分節化が回復する胎齢 9.5 日の尾芽では減少していた (図 9 J-L)。さらに *Fgf8* の発現も減少を示した (図 9 G-I) しかし、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚において、他の尾芽マーカー遺伝子は、

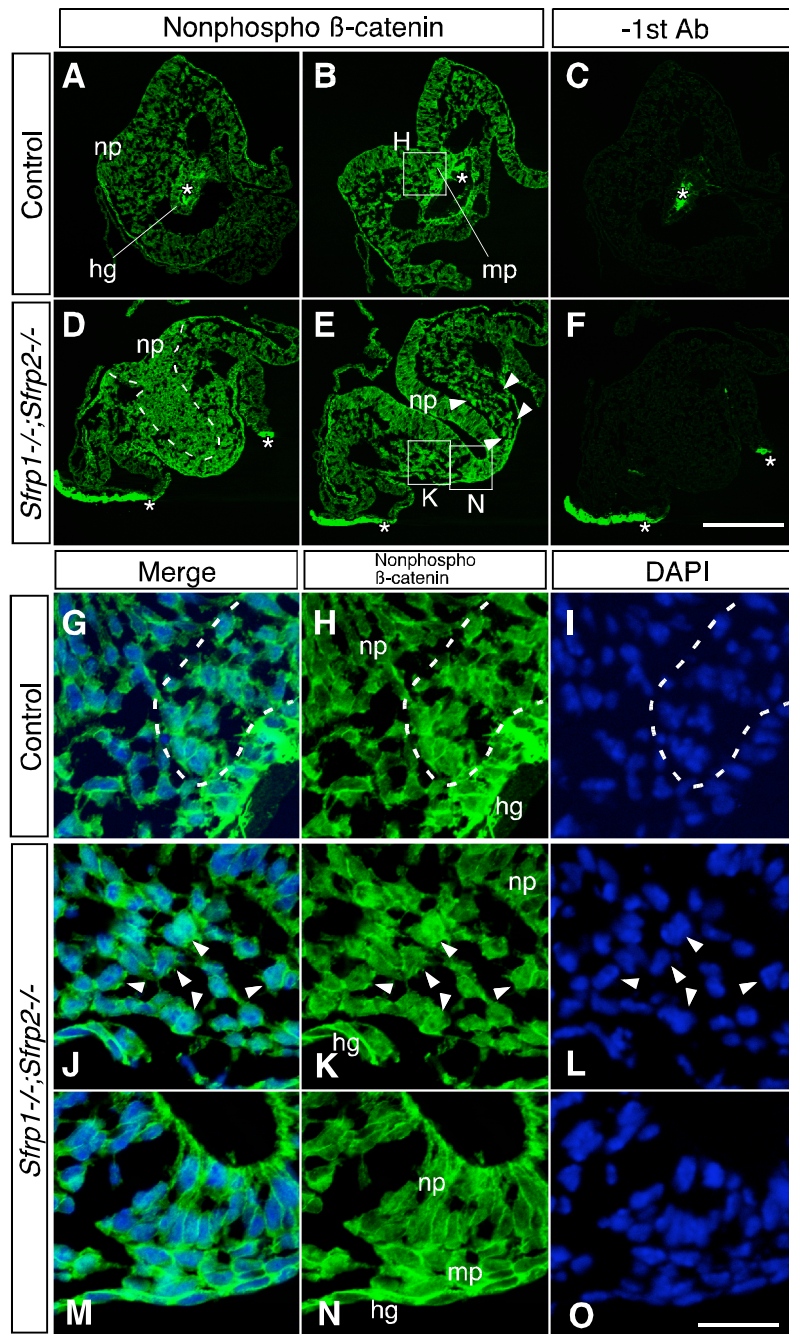


図7、胎齢8.5日のSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚の尾芽におけるWnt/ β -catenin経路の活性。

(A-F) 抗脱リン酸化 β -catenin抗体で染色したコントロール胚(A、B)とSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚(D、E)における尾側領域の横断面。一次抗体なしのコントロール染色を行なった(C、F)。hg、後腸; mp、原条下の中胚葉細胞; np、神経板; 星印、非特異的な染色。より高い染色の強度がコントロール胚の後腸と中軸中胚葉で観察された。後腸の内胚葉と原条下の中胚葉と同様の染色強度がSfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}胚の中胚葉、神経外胚葉、側面に局在する沿軸中胚葉を含む尾芽領域(矢じりの内側とKと標示した四角内; E)で観察された。スケールバー: 200 μ m。

(G-O) BとE内の四角で標示した領域(H、K、Nと表した)の拡大図。原条下の中胚葉をH内に破線で囲む。核をDAPI (4,6-diamino-2-phenylindole; 青色)で染色した(I、L、O)。G、J、Mは、HとI、KとL、NとOをそれぞれ合成した図である。J内の矢じりは、元の図(KとL)で染色された位置の一致した細胞を示す。スケールバー: 33 μ m。

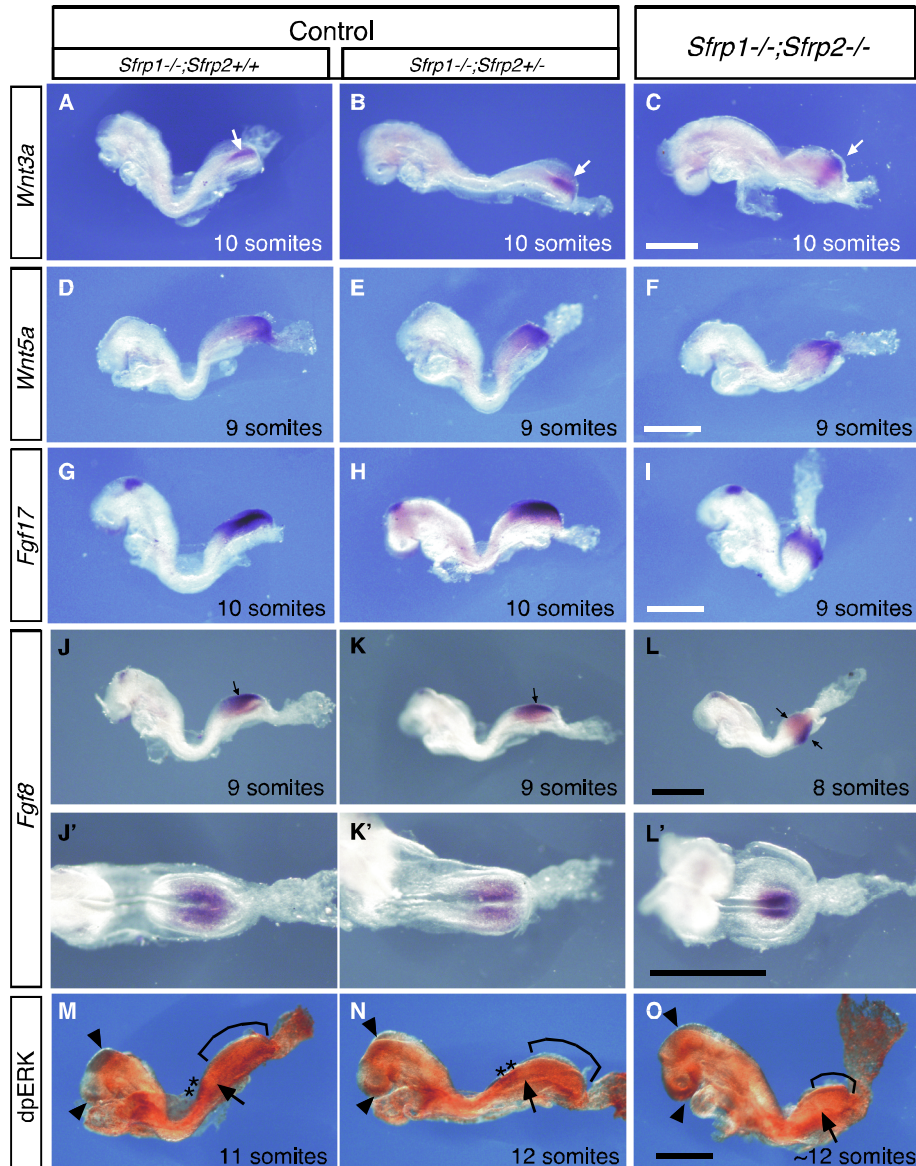


図8、胎齢8.5日の*Sfrp1*と*Sfrp2*の二重ホモ変異胚における*Wnt3a*と尾芽マーカ遺伝子の発現。
 (A-L) *Wnt3a* (A-C; 白矢印)、*Wnt5a* (D-F)、*Fgf17* (G-I)、*Fgf8* (J-L; 黒矢印) の発現レベルは*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚において影響しない。(J'-L') J-Lの胚の背側図。
 (M-O) ニリン酸化ERKタンパク質 (dpERK) の発現は、コントロール胚 (M, N) と同様に*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (O) の尾芽でもFgfシグナルの活性を示唆した。矢じりは、*Fgf8*の発現と一致する領域を示す；矢印は、新しく形成される体節 (星印) の近隣でdpERK活性がより低くなっている領域を示す。胚の詳細な時期は、体節の数で標示した。スケールバー；500 μm。

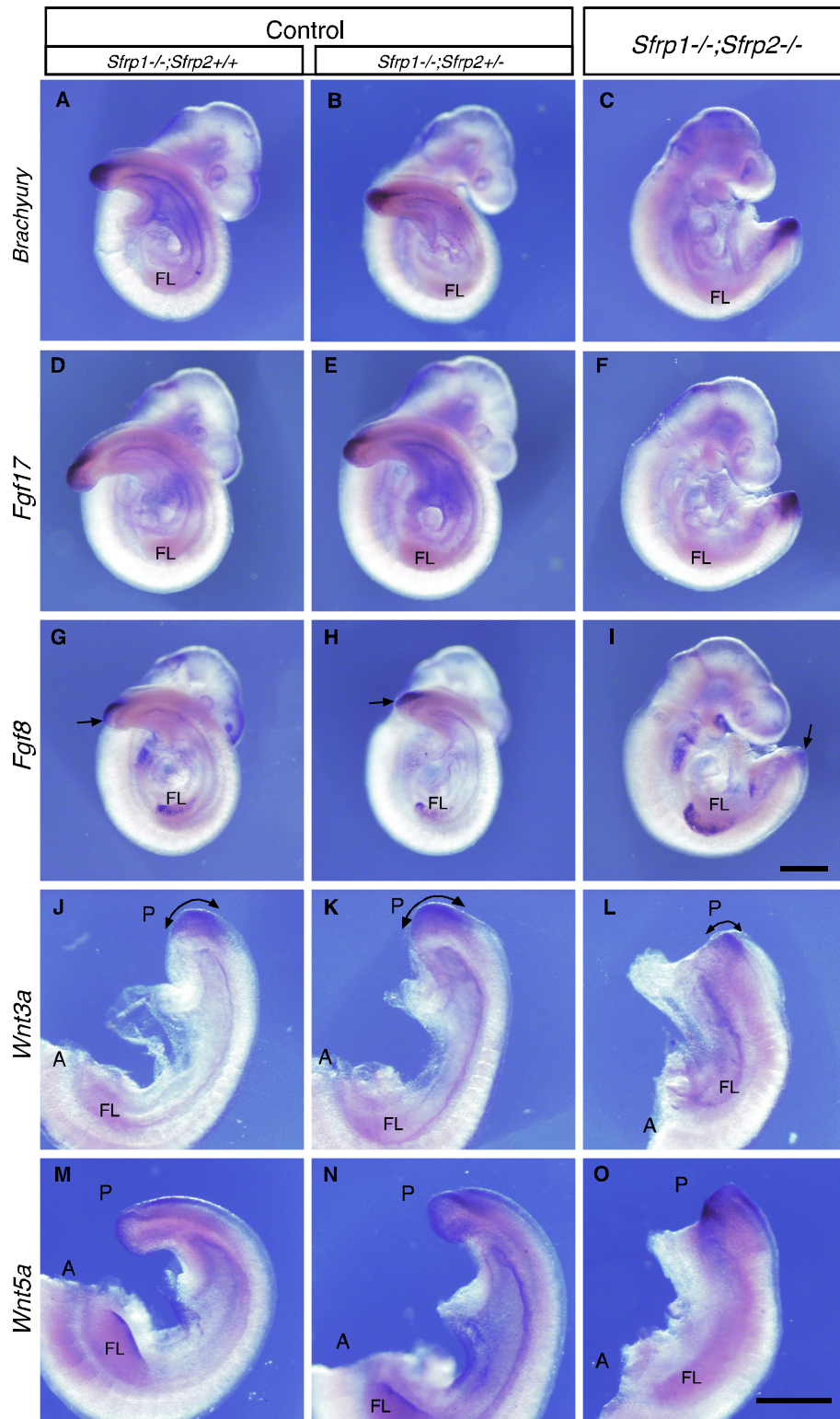


図9、胎齢9.5日の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における*Wnt3a*と*Fgf8*の発現は減少する。
 (A-F) コントロール胚 (A, B, D, E) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (C, F) における (A-C) と*Fgf17* (D-F) の発現。尾芽が*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚で形成されることに注目。
 (G-L) *Fgf8* (G-I; 矢印) と*Wnt3a* (J-L; 曲状矢印) の発現がコントロール胚 (G, H, J, K) と比べて*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (I, L) で減少した。
 (M-O) コントロール胚 (M, N) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (O) における*Wnt5a*の発現。FL; 前肢; A, 頭側; P, 尾側。スケールバー: A-Iでは500 μm; J-Oでは500 μm。

正常なレベルで発現した (図 9 A-F、M-O) (Maruoka et al., 1998; Yamguchi et al., 1999)。これらの観察から、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における体節の分節化異常は *Wnt3a* の発現レベルに関係すると予想した。一方、規則的な体節形成の回復は、*Sfrp1* と *Sfrp2* の不活性化による Wnt 活性の上昇が、9.5 日胚に見られる尾芽の *Wnt3a* 発現の減少により、正常な体節の分節化に影響しないレベルまで低下したためと推定される。以上の結果から、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の体節形成異常が、*Wnt3a* の発現に関連した現象であることを予想した (Aulehla et al., 2003)。

そこで、10 から 13 体節期の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における Notch シグナル関連遺伝子である Lunatic fringe (*Lfng*) と *Hes7* の振動性発現を調べた。Notch シグナルに関連する *Lfng* と *Hes7* の発現振動は、体節の分節化過程に必須であり (Forsberg et al., 1998; Evrard et al., 1998; Cole et al., 2002; Morales et al., 2002)、*Wnt3a* 変異胚で規則性を失う (Aulehla et al., 2003)。まず、*Lfng* の周期的発現について、縦に半分にした尾部を培養の有無で比較し、観察した。また、その発現パターンは Forsberg らによる報告に基づき検討を行った (図 10 G) (Forsberg et al., 1998)。胎齢 8.5 日のコントロール胚における尾の断片対は、全て周期的な発現を示した (n=18、図 10 A、D、G)。これと対照的に、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の尾の断片対では、*Lfng* の周期的発現の乱れが観察された (n=7、図 10 B、C、E、F)。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、主に、発現振動の遅延が予想され、PSM の最も前方で発現部位が残っているように見える場合があること (図 10 C、F に剣標として標示; 尾断片 7 対中 2 対) も、このことを裏付けると考えた。興味深いことに、胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、周期的な *Lfng* の発現が観察され、コントロール胚における発現と区別できなかった (コントロール; n=11、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}; n=3、図 10 H、I)。このことは、振動性遺伝子の発現異常が体節の分節化に影響することを示唆する。

Hes7 の発現は Notch シグナルによって制御され、*Hes7* タンパク質は *Lfng* の発現を抑制する (Bessho et al., 2001; 2003)。コントロール胚の尾の断片対は、培養条件下でも *Hes7* の正常な振動性発現を示す (図 10 J、M; n=6) が、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚は、周期的な発現に乱れを生じた (尾断片 5 対中 3 対、図 10 K、L、N、O)。また、*Lfng* の発現と同様に、PSM 最前部領域に、余剰なストライプ状の発現が、しばしば観察された (図 10 L、N に剣標として標示; 尾断片 5 対中 2 対)。これらのことから、*Sfrp1* と *Sfrp2* は、体節の分節化過程における Notch シグナル振動性遺伝子の周期的発現に影響することが示唆される。

これまでに、Wnt シグナル抑制的調節因子である *Axin2* と *Nkd1* について、PSM における周期的な発現が報告されている (Aulehla et al., 2003; Ishikawa et al., 2004)。Wnt 関連の振動性因子 *Axin2* の周期的な発現 (Aulehla et al., 2003) は、

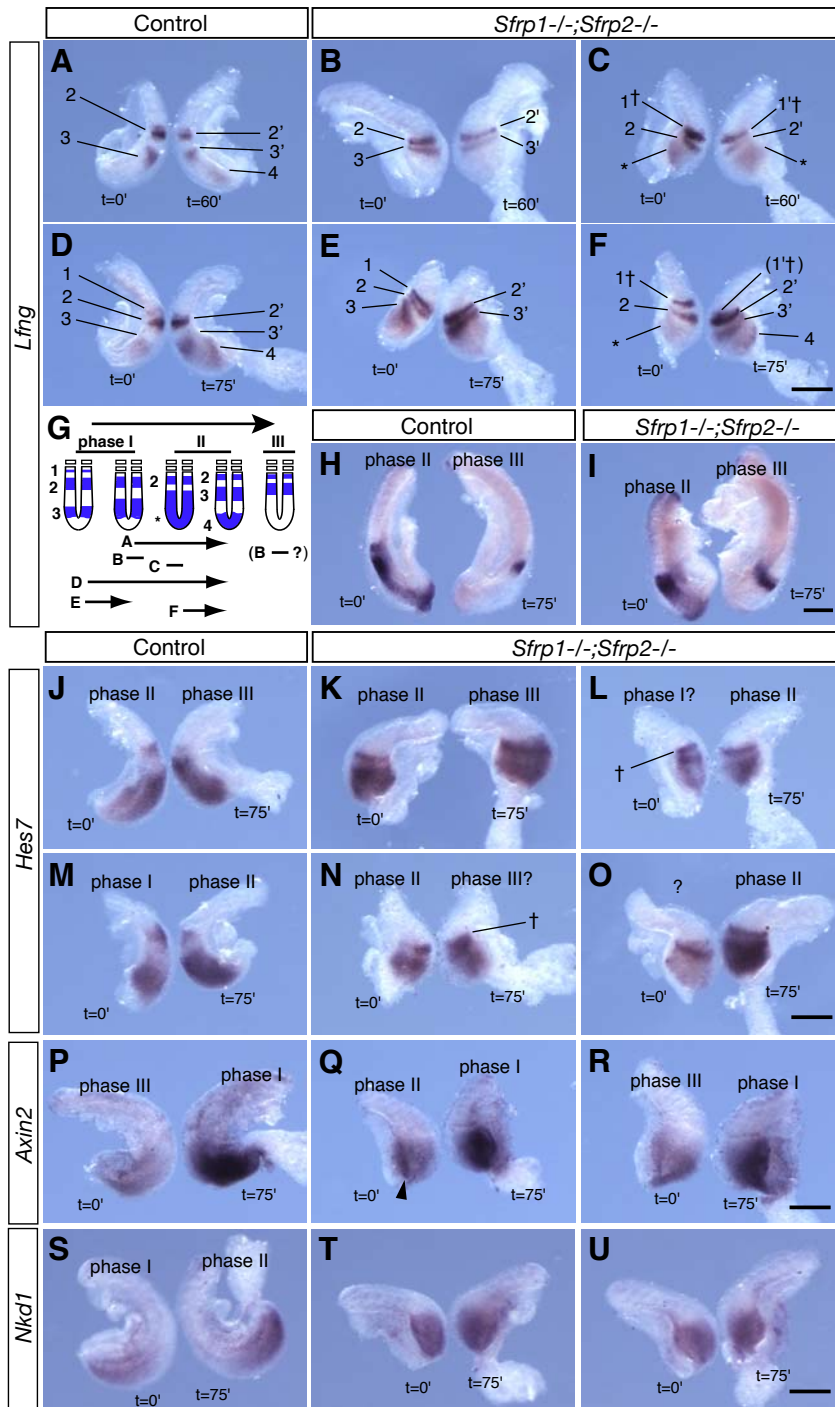


図1 O、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における体節形成期の周期遺伝子の発現。

(A-F) 胎齢8.5日の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚のPSMで変化した*Lfng*の振動性周期。コントロール胚 (A、D) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (B、C、E、F) における*Lfng*の発現変動を尾側組織の半分を異なる時間培養することで検討した [A、B、C、0分 (t=0') と60分 (t=60') ; D、E、F、0分 (t=0') と75分 (t=75')]。剣標は、PSMの最前部での強い余剰なバンドを示す。スケールバー：250 μm。
(G) コントロール胚と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の移植片における*Lfng*発現の模式図。*Lfng*の帯状の発現領域を数によって示す。

(H、I) 胎齢9.5日のコントロール胚 (H) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (I) の移植片における*Lfng*の発現変動。尾側組織の半分を0分 (t=0') と75分 (t=75') 培養した。スケールバー：250 μm。

(J-U) *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚のPSMにおける*Hes7*、*Axin2*、*Nkd1*の発現。尾側組織の半分を0分 (t=0') と75分 (t=75') 培養した。

(J-O) 胎齢8.5日のコントロール胚 (J、M) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (K、L、N、O) の移植片における*Hes7*の発現。*Hes7*の発現は大部分の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}移植片で乱れた (L、N、O)。ほぼ正常な*Hes7*の発現がごく一部の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}移植片で観察された (K)。剣標はPSMの最前部での強い余剰なバンドを示す。スケールバー：250 μm。

(P-R) 胎齢8.5日のコントロール (P) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (Q、R) の移植片における*Axin2*の周期的な発現。矢じりは、原条における*Axin2*の高い発現領域を表す。*Axin2*発現のバンドはより早い胚期ではコントロール胚でさえ同定しにくい。スケールバー：250 μm。

(S-U) 胎齢8.5日のコントロール (S) と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (T、U) の移植片における*Nkd1*の発現。スケールバー：250 μm

コントロール胚 (n=19) と同様に *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚 (n=5) の尾の断片対で観察された (図 1 0 P-R)。一方、Wnt シグナルの下流で活性化され、振動を示す *Nkd1* の発現 (Yan et al., 2001) は、多くのコントロール胚の尾の断片対 (89% ; 合計 n=9) で発現変動を示したのに対し、ほとんどの *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の尾断片対 (75% ; 合計 n=8) は高い発現の強度を保ったままであった (図 1 0 S-U)。この結果から、*Sfrp1* と *Sfrp2* の不活化による Wnt シグナルの下流標的遺伝子の活性化を予想する。したがって、*Sfrp1* と *Sfrp2* による Wnt シグナルの抑制が体節形成過程に必要であると考えた。

***Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* は機能的に重複する**

さらに Sfrps の胚発生における役割を解析するため、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の多重変異体マウスを作製した (図 1 1、表 2 A)。*Sfrp1* と *Sfrp5* の発現は、7.5 日胚で anterior visceral endoderm (AVE) において重複する (図 1 2 A、B、H、I) (Hoang et al, 1998)。8.5 日胚では、*Sfrp1* と *Sfrp2* の発現は、頭尾軸に沿った神経外胚葉で重複して観察される (図 1 2 C、F) (Leimeister et al., 1998、Finley et al., 2003)。また、私の研究により、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚は、胸部領域で頭尾体軸伸長の不全と体節形成の異常を示すことが明らかになった。これらのことから、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の機能的な重複を予想した。

Sfrp1^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} に加えて、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}、*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}、*Sfrp1*^{+/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}、*Sfrp1*^{+/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}の遺伝子型マウスを作製したが、これらの多重変異体は野生個体と同様に成育し、正常に繁殖した (表 2 B、C)。また、稀に、*Sfrp2* のホモ変異遺伝子座を持つ多重変異体に、後肢の合肢症と尾の捻れ (Kinked tail) を認めたが、調べた範囲で、胚発生全般における形態的な異常は認めていない (Satoh et al., 2006; Cox et al., 2006)。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}マウス同士の交配で得た *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚は、胎齢 12.5 日付近で胚性致死となり、体幹部における頭尾軸方向の著しい短縮を示した。これは、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の表現型を重篤にしたものであった (図 1 3 A、表 2 D)。これらの観察から、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* は機能的に重複していることが明らかになった。

***Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚は神経管の閉鎖不全と頭尾軸方向の伸長異常を示す**

胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚では、後脳から尾側末端まで、神経管の閉鎖異常 (脊椎破裂) が観察された。また、胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚における *Shh* (Echelard et al., 1993) と *Msx1* (Robert et al., 1989) の発現は、コ

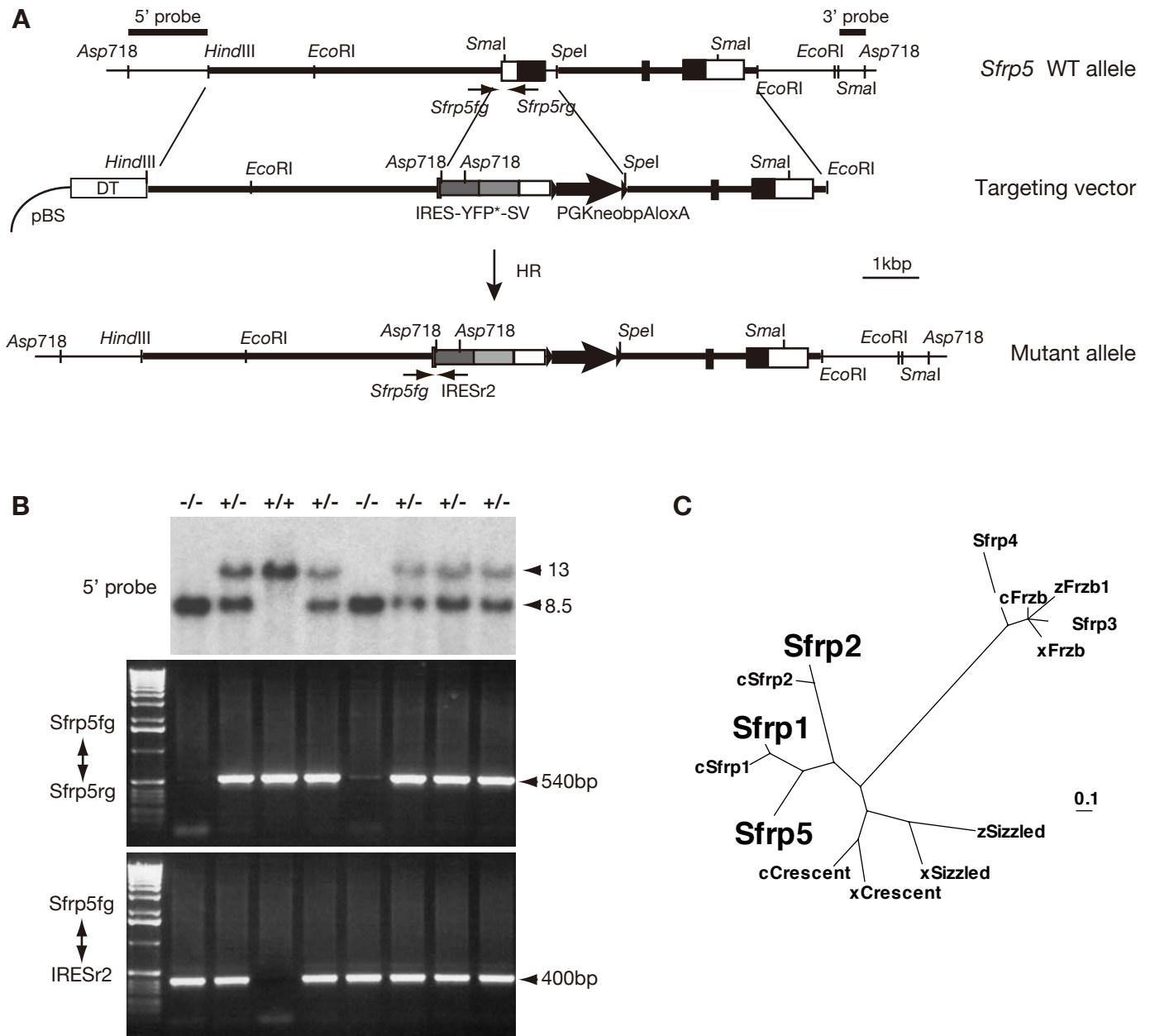


図 1 1、Sfrp5の変異体マウスの作製

(A) Sfrp5の相同遺伝子組み換え。第一エクソン内のCRDの配列をターゲティングカセットと置換させた（材料と方法を参照）。
 (B) ヘテロ接合型マウス同士の交配から生まれた仔の尻尾から抽出したDNAのサザンブロット（上）とPCR解析（下）。
 (上) 5' プローブによるAsp718処理DNA断片の検出。13. 0kb断片は野生型、8. 5kb断片は変異体型を示す。
 (下) sfrp5fg/sfrp5rgのプライマーの組み合わせによるPCR。540bpの野生型特異的なDNA断片を増幅する。sfrp5fg/IRESr2のプライマーの組み合わせによるPCR。400bpの変異体型特異的なDNA断片を増幅する。Aにそれぞれのプライマーの位置を示した。
 (C) Sfrpファミリー遺伝子の系統樹。Sfrp1、Sfrp2、Sfrp5は同じサブファミリーに属する。

表 2、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*の機能的相補：離乳後の出生児の遺伝子型 (%)

A、*Sfrp5*のノックアウトマウス

両親の遺伝子型	<i>Sfrp5</i> ^{+/+}	<i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
<i>Sfrp5</i> ^{+/-} x <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	36 (27)	66 (49)	32(24)	134 (100)

B、*Sfrp5*と*Sfrp1*もしくは*Sfrp2*の多重変異体マウス

両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/+}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-} x <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	35 (26)	70 (52)	30(22)	135(100)

両親の遺伝子型	<i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/+}	<i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
<i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-} x <i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	19 (25)	42 (55)	15(20)	76(100)

C、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*の多重変異体マウス

両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	合計
<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-} x <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	61 (52)	57 (48)	118(100)

両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{+/-} x <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	73 (27)	67 (25)	65 (24)	62 (23)	267(100)

両親の遺伝子型	<i>Sfrp1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	<i>Sfrp1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-} x <i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	50 (48)	54 (50)	104 (100)

D、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-} マウス同士の交配によって得られた胚もしくは仔の遺伝子型[%]

胚期	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	<i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp5</i> ^{-/-}	合計
E7.5	2	8	2	12
E8.5	92 [24]	185 [48]	106* [28]	383 (100)
E9.5	27 [24]	51 [45]	36* [32]	114 (100)
E10.5	3	10	8*	21
E12.5	3	4	0	7

*, 全て他の遺伝型の胚と形態的に区別できた胚(吸収胚の数)

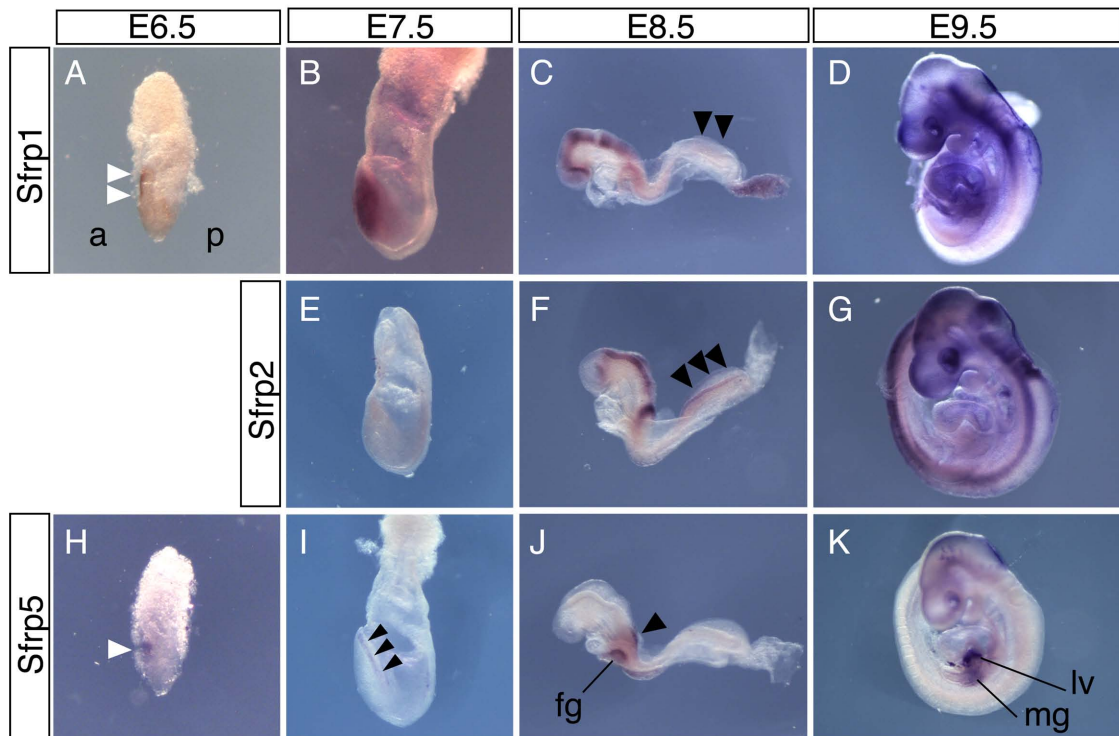


図12、胎齢6.5から9.5日のSfrp1、Sfrp2、Sfrp5の発現。

(A-D) 胎齢6.5から9.5日胚におけるSfrp1の発現。

(E-G) 胎齢7.5から9.5日胚におけるSfrp2の発現。

(H-K) 胎齢6.5から9.5日胚におけるSfrp5の発現。

原腸胚期に、Sfrp1とSfrp5はAVEで発現が重複する。

8.5日胚では、Sfrp1とSfrp2の発現は、前脳、中脳、後脳、尾側の神経板の一部で重複する。

一方、Sfrp1、Sfrp2、Sfrp5の重複する発現が、後脳より尾側の一部の神経板で見られた。

fg、前腸。mg、中腸。lv、肝臓。

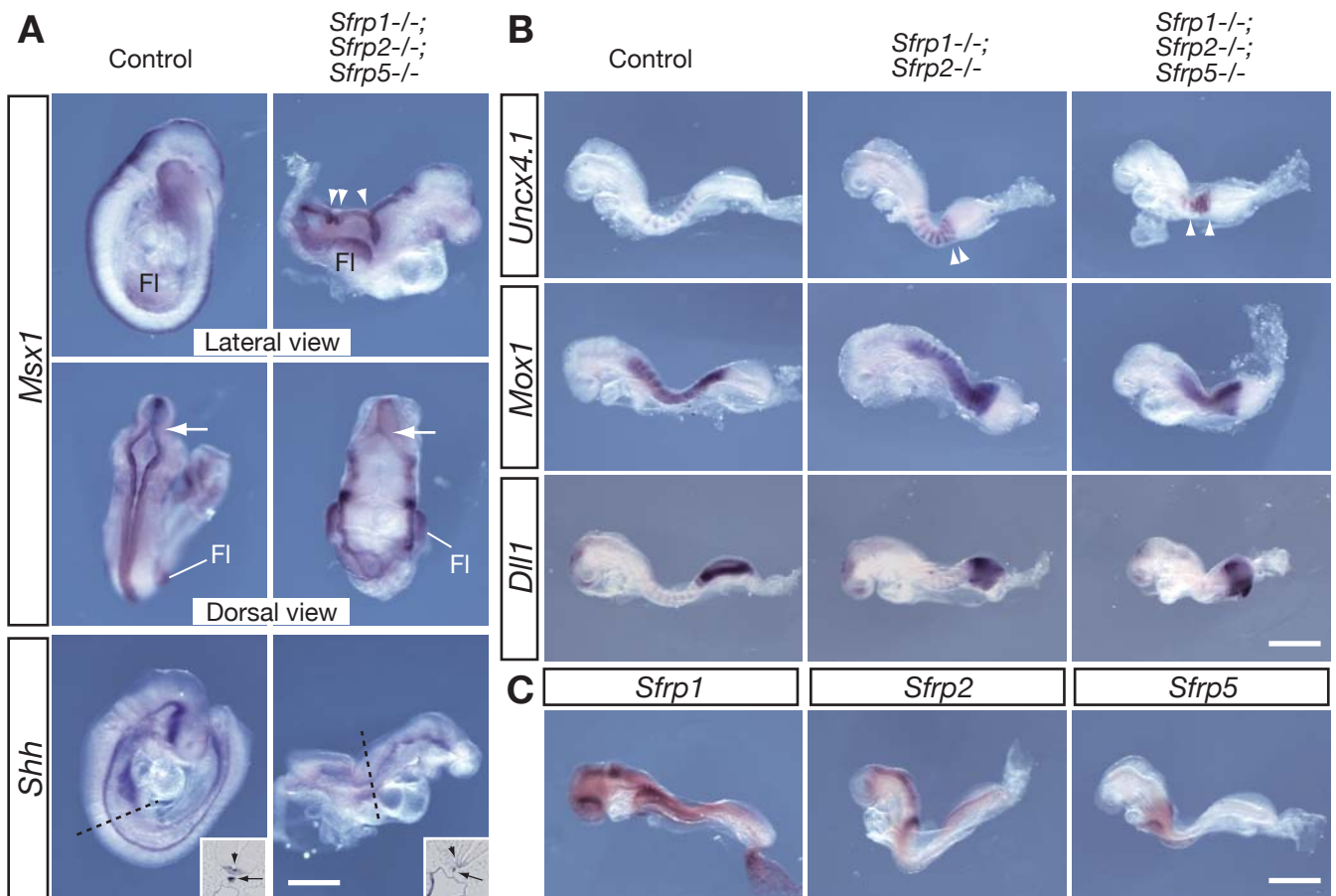


図 13、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の三重ホモ変異胚は神経管の閉鎖不全と頭尾軸の伸長異常を示す。

(A) 胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚は神経管の閉鎖異常を示す。側面図 (上図) と背側図 (中央図)。*Msx1* の発現はコントロール胚の背側神経管で見られる。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚は神経管閉鎖不全を示す。*Msx1* の発現 (矢じり) より、異常な神経板の縁の融合が予想される。矢印はそれぞれの中脳後脳の境界地点を指す。*Shh* の発現 (下図) は、*Msx1* の発現と合わせて観察するとコントロール胚と同様に *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚でも神経管の背腹軸形成が生じていることを示唆する。

破線に沿って作製した切片 (挿入図) は、底板 (矢じり) と脊索 (矢印) における *Shh* の発現を表す。スケールバー : 500 μm。

(B) 胎齢 8.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚と *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚における体節形成の比較から、*Sfrps* の三重ホモ変異胚の体幹部における頭尾軸の著しい短小化が観察された。*Uncx4.1* と *Mox1* の発現は、二重ホモ変異胚で見られる体節よりも三重ホモ変異胚の体節の方がより頭尾軸方向への短縮を示し、その領域は *Sfrp5* の発現している領域 (C) と一致した。*Dll1* の発現から、三重ホモ変異胚の PSM は二重ホモ変異胚と同程度短小化する。スケールバー : 500 μm。

(C) *Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の発現は、体幹部における頭尾軸方向に沿った *Sfrps* の減衰する勾配の存在を意味する。

スケールバー : 500 μm。

ントロール胚と同様にそれぞれ腹側と背側の神経板で観察され (図 1 3 A)、神経板の背腹軸形成を示唆した。

胎齢 8.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚と比べて、より頭尾体軸の短縮を示した (図 1 3 B)。また、*Krox20* の発現から、後脳においても、頭尾軸に沿った短縮が示唆されたが、これを含む脳や脊髄の領域化マーカー遺伝子の発現から、頭尾軸に沿った神経系組織の領域化は、胚の形態から予想されたレベルで正常であるように見えた (図 1 4)。さらに、原条の形成も 8.5 日胚で維持されていることをマーカー遺伝子の発現で確認した (図 1 5)。神経管の閉鎖に加えて、頭尾体軸伸長の不全が見られたことにより、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* が収斂伸長運動に関連すると推定した (Torban et al., 2004)。

興味深い事に、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚では、野生型胚との形態的な差異が顕著になる以前の late bud 期に、すでに、中軸中胚葉の分布に影響が観察された。Late bud 期または late head fold 期の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚では、*Shh* を発現する中軸中胚葉が側方に広がって分布していた (図 1 6 A)。この様に、中軸中胚葉の収斂伸長運動における異常が予想されたため、結節に由来する細胞の移動を直接的にモニターすることにした。Late bud/early head fold 期の結節近くの組織を *DiI* で標識した後 (図 1 6 B)、胚を培養したところ、コントロール胚 (n=3) において、標識された組織は頭尾軸方向に分布したが、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚 (n=3) では、その分布が著しく減少した。これらの結果は、*Sfrps* の重複した機能が PCP 経路に関連した収斂伸長に必要なことを示唆する (Wang et al., 2006)。

Sfrps は Vangl2 と遺伝学的に相互作用する

中軸中胚葉の収斂伸長に異常を示す変異体として *Loop-tail (Lp)* マウスが知られている。*Lp* マウスは、PCP 経路の構成遺伝子 *Vangl2* に変異を有する遺伝子変異マウスである。*Sfrps* が non-canonical 経路を調節している可能性を検討するために、*Sfrps* 変異体と *Lp* の多重変異体マウスを作製した。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスの雌と *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスの雄を交配させ、胎齢 14.5 日目の *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}胚を観察した。これによって、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}を有する *Lp* ヘテロ接合変異の約 13% (n=16) が、局所的な神経管閉鎖不全である脊椎披裂を示した (図 1 7 A、B) が、この割合は、以前報告された *Lp* ヘテロ変異単独の場合と同様であった (Lu et al., 2004)。一方、ここに *Sfrp2* ヘテロ変異が加わった胚 (*Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}胚) においては、脊椎披裂を示す頻度は 62% (n=13) に上昇した (図 1 7 A、B)。さらに、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}マウスの雌と、生き残った *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-}マウスの

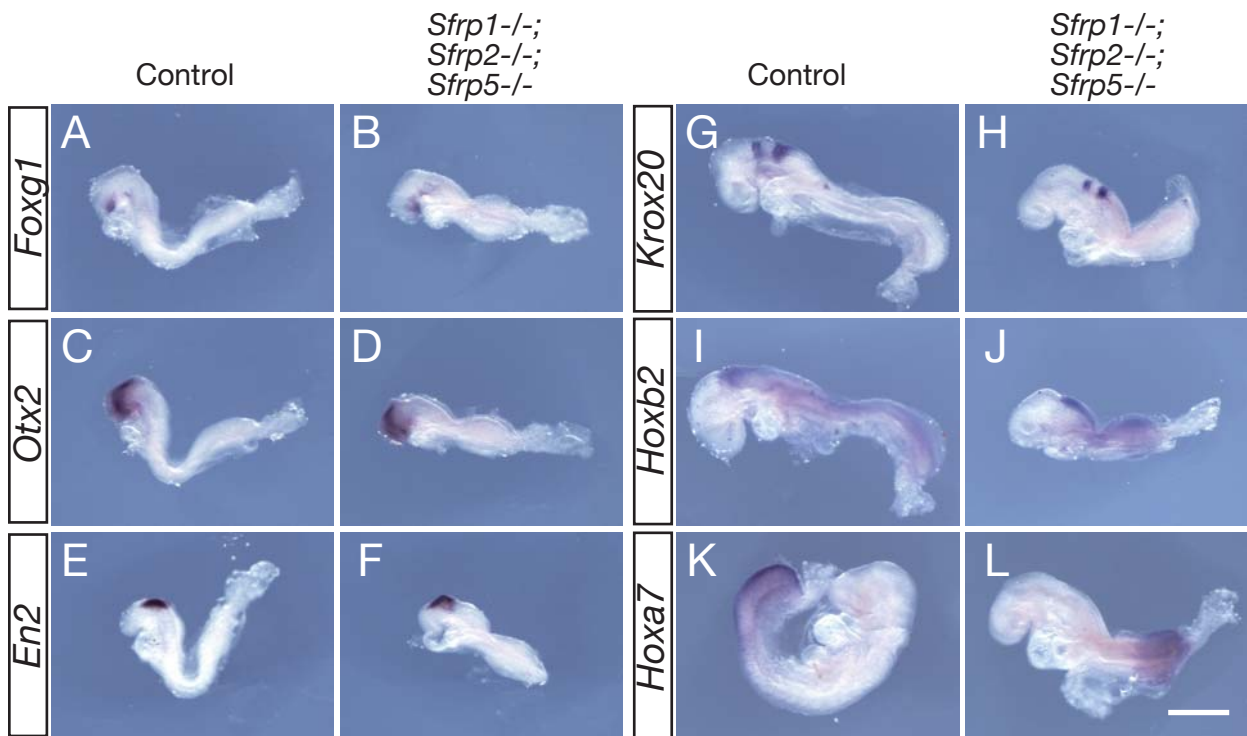


図14、胎齢8.5-9.0日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚における神経管の頭尾軸のパターン形成。

(A-L) 前脳から後脳のマーカーである *FoxG* (A, B)、*Otx2* (C, D)、*En2* (E, F)、*Krox20* (G, H) は、他の尾側マーカーである *Hox2b* (I, J)、*Hox7a* (K, L) と同様に、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚の中枢神経組織における頭尾軸に沿った領域化を示唆する。

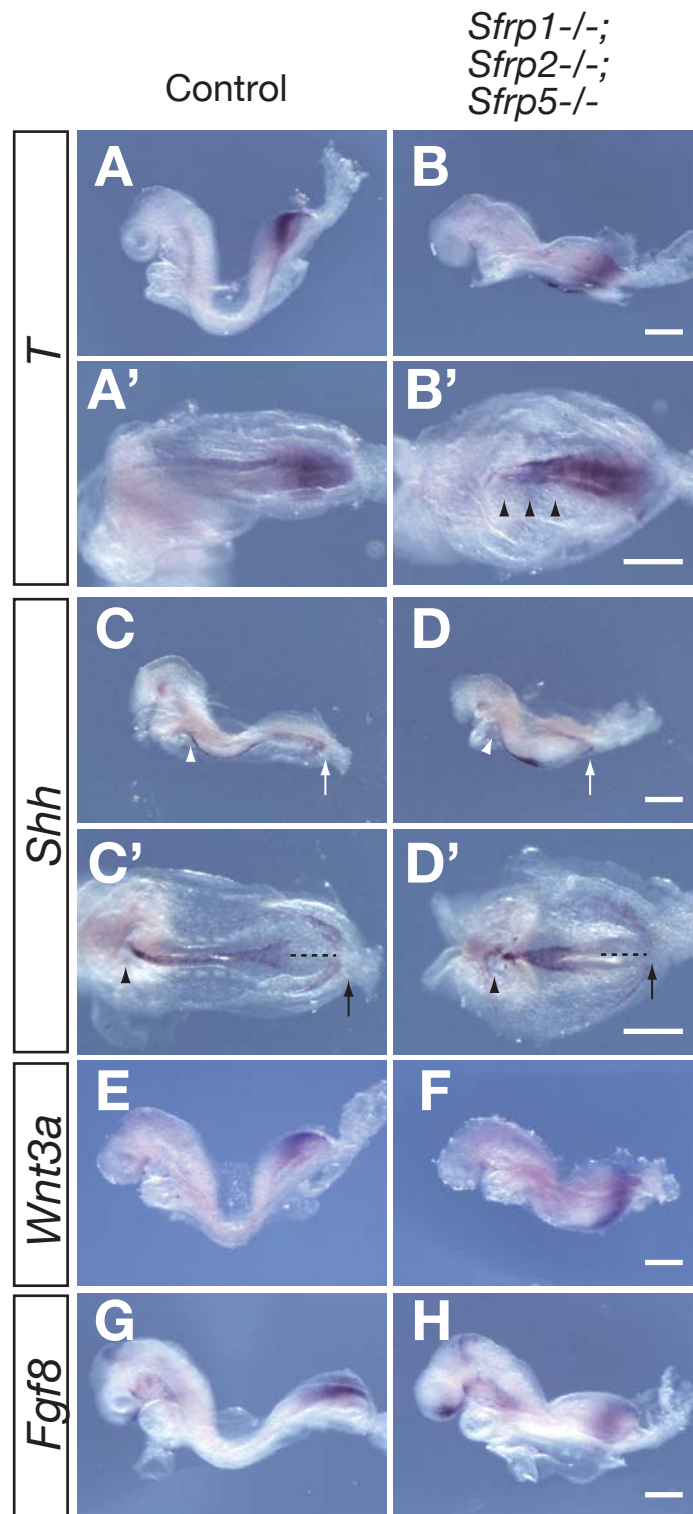


図 1 5、胎齢 8.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚における脊索と原条の形成。

(A、A'、B、B') *T* の発現は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚において正中線で広がって観察される (腹側図)。

(C、C'、D、D') *Shh* の発現は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚において中軸中胚葉の側方に広がった分布を示す (腹側図)。正中線に沿った尾側での *Shh* 発現 (破線) は原条の位置を示す。矢印と矢じりは、それぞれ前腸の空間と尾芽の尾側末端を指す。

(E、F、G、H) *Wnt3a* と *Fgf8* の発現は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚の尾側で見られる。

スケールバー ; 250 μ m。

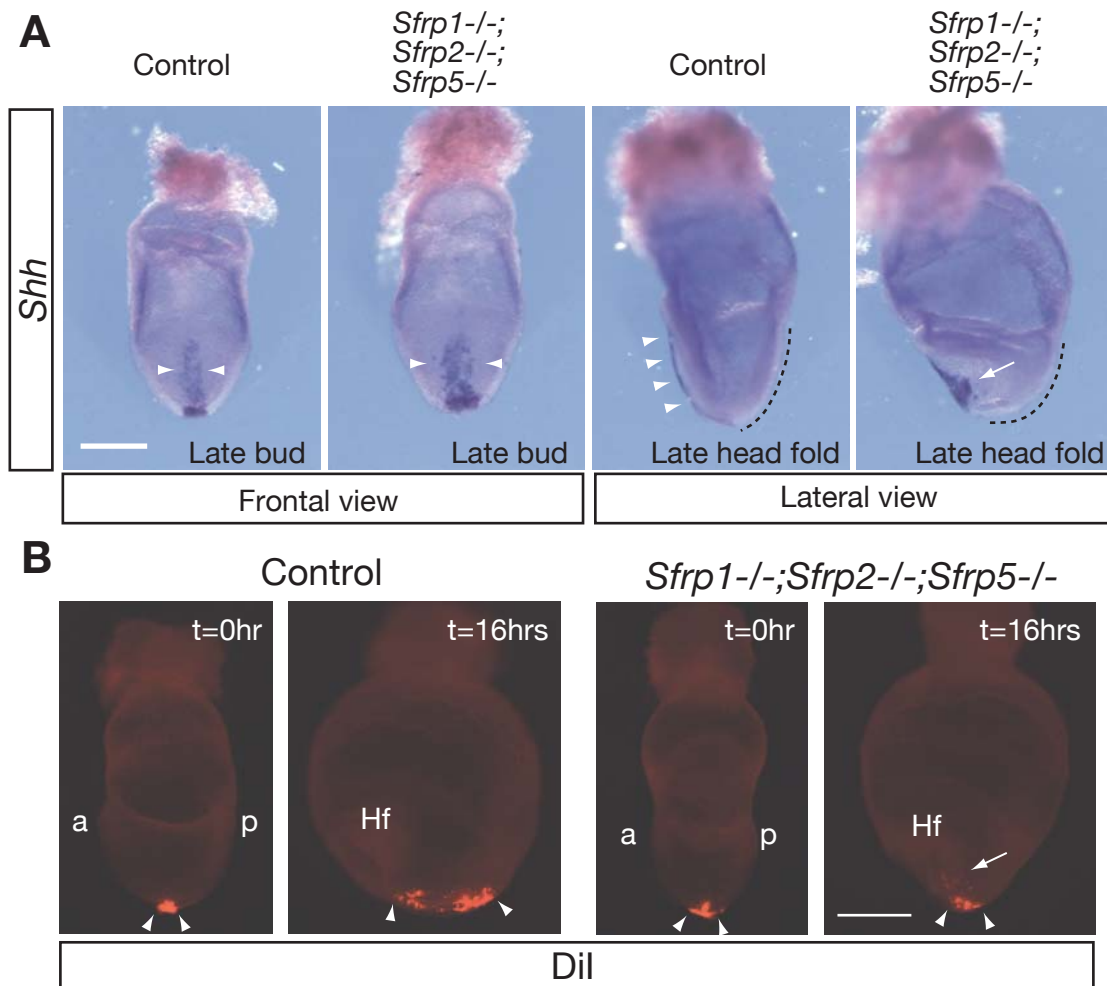


図16、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚は収斂伸長の異常を示す。

(A) Late bud期 (左) と late head fold期 (右) のコントロール胚と *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚における *Shh* の発現。矢じり間の中軸中胚葉における *Shh* の発現は late bud期の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚でより広い分布を示す。中軸中胚葉は late head fold期のコントロール胚では正中線 (矢じり間) に局在するが、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚では側面方向 (矢印) に局在する。破線は原条を示す。スケールバー：250 μ m。

(B) Early bud期の結節近傍で *DiI* 標識された細胞 (矢じり間、t=0) は、16時間全胚培養した後、コントロール胚 (左) と比較すると *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚 (右) では頭尾軸方向 (矢じり間、t=16) の伸長が著しく減少し、側方 (矢印) に局在した。スケールバー：250 μ m。a、頭側；p、尾側；HF、頭褶。

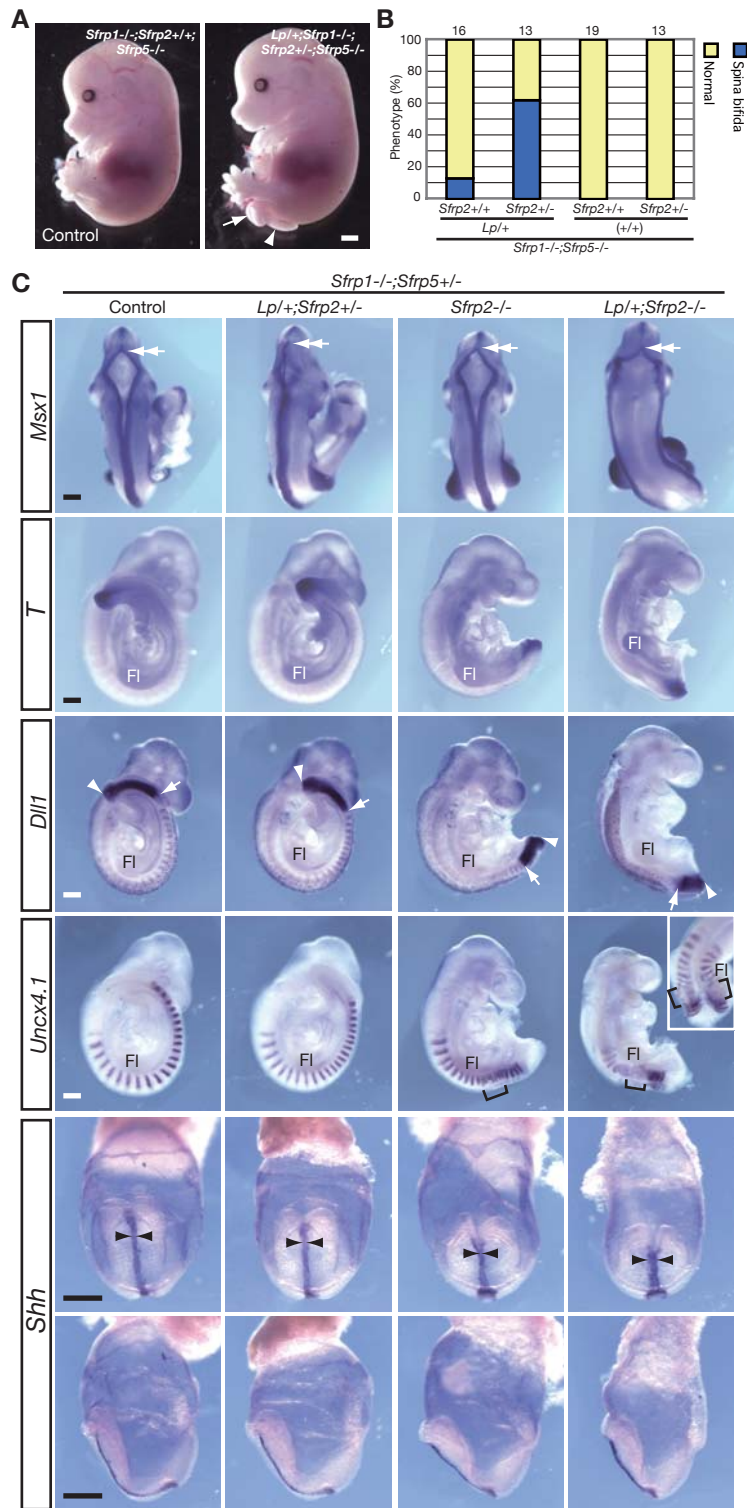


図 17、Sfrps は PCP 構成遺伝子である Vangl2 と遺伝学的に相互作用する。

(A) 胎齢 14.5 日の *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚で見られる脊椎披裂。コントロール胚 (*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚もしくは *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚) では、脊椎披裂は観察されない。矢印と矢じりはそれぞれ loop-tail と脊椎披裂を示す。スケールバー：1mm。

(B) 14.5 日胚における神経管閉鎖不全 (Spina bifida) の頻度。胚は、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Sfrp5*^{-/-} マウスと *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} マウスの交配で得た。4 遺伝子型の胚の個体数を上に示す。Normal、正常な神経管の閉鎖。

(C) 胎齢 9.5 日の *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚は頭蓋脊椎披裂と頭尾軸方向の伸長不全を示す。*Msx1* の発現は *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚での神経管閉鎖不全を示唆する。*T*、*Dll1*、*Uncx4.1* の発現から、*Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚における頭尾軸方向の伸長異常は、体幹部、特に *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚で見られるよりも顕著なことが示唆される。*Shh* の発現から、胎齢 7.5 日の *Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚では、late head fold 期において、他の遺伝子型胚と比較すると、中軸中胚葉が正中線より側方に分布して観察された。白い二重矢印、矢印、矢じりはそれぞれ、中脳後脳境界線、PSM の前側境界、尾芽の末端を表す。角括弧は体節の分節化異常を示す領域を指す。Fl、前肢芽。スケールバー：500 μm。

雄を交配させ、胎齡 9.5 日の *Lp/+;Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚を回収した。この *Lp/+;Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚は、常に、頭蓋脊椎披裂 (n=17) を示した (図 1 7 C)。一方、*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚 (n=17) と *Lp/+;Sfrp1-/-;Sfrp2+/-;Sfrp5-/-* 胚 (n=41) のいずれにおいても、この重篤な神経管閉鎖異常は観察されない。

また、尾芽、PSM、さらに、体節のマーカー遺伝子としてそれぞれ、*T*、*Dll1*、*Uncx4.1* の発現を検討した (Bettenhausen et al., 1995、Mansouri et al., 1997)。その結果、*Lp/+;Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚の体節形成は、*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚と同様に前肢以降の領域で不整となり、尾側領域で回復した。しかし、頭尾体軸伸長不全は、*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚より、顕著であることが示された (図 1 7 C)。特に、最初の数体節より尾側で重篤であった。さらに、胎齡 7.5 日目の late head fold 期の *Lp/+;Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5+/-* 胚は、収斂伸長異常を示し、中軸中胚葉が側方に広がって分布することが、*Shh* の発現から確認された (図 1 7 C)。これらの遺伝学的解析から、*Sfrps* が PCP 経路の調節を介して頭尾体軸伸長に関与することが明らかとなった。

Sfrps は Wnt/ β -catenin 経路を介して体節形成を調節する

Sfrp1-/-;Sfrp2-/-、*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5-/-* のいずれの多重ホモ変異胚においても、体節形成異常は、頭尾体軸の伸長に関する異常と密接に関連しているように見える。実際、*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-* 胚における観察と類似して、8 から 11 体節期における *Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5-/-* 胚の PSM では、*Lfng* の発現の周期性が乱れた (図 2 0 A-F)。PSM における *Lfng* の周期的発現は、*Wnt3a* 遺伝子の変異によって影響を受ける。また、変調した *Lfng* の発現は体節不整を引き起こす原因と考えるに十分である。一方、胎齡 8.5 日の *Sfrp1-/-;Sfrp2-/-;Sfrp5-/-* 胚では、*Wnt3a* の発現レベルはほぼ正常であった (図 1 5 E、F)。*Sfrp1-/-;Sfrp2-/-* 胚における観察と合わせて (Sato et al., 2006)、*Sfrps* による Wnt/ β -catenin 経路の阻害が体節の分節化過程に必要であることが予想される。

そこで、Wnt/ β -catenin 経路の阻害が体節形成の過程で必要である直接的な証拠を得るため、*Sfrps* と *Dkk1* の多重変異体マウスを作製した (表 3)。*Dkk1* は Wnt/ β -catenin 経路の分泌性阻害因子である (Kawano and Kypta, 2003)。*Dkk1-/-* 胚では、仙椎の軽度な融合が報告されている (MacDonald et al., 2004)。*Dkk1* の発現は、late head fold 期の原条の尾側で見られ、8.25 から 9.25 日胚の PSM で振動する (図 1 8 A、B)。さらに進んだ 9.75 日胚では、尾側の *Dkk1* 発現が腹側の尾芽に限局される (MacDonald et al., 2004)。PSM における *Dkk1* の周期的発現は、8.5 日胚の尾領域を半分にして *Lfng* の発現と比較した結果、逆の発現変動パターンを示した。*Lfng* 発現の帯状の発現領域 (s-0 と s-1) から判断すると、*Dkk1* 発

表 3、*Dkk1*^{+/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} マウスの作製：離乳後の出生児の遺伝子型(%)

両親の遺伝子型	<i>Dkk1</i> ^{+/+} ; <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Dkk1</i> ^{+/+} ; <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	<i>Dkk1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/+}	<i>Dkk1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-}	合計
<i>Dkk1</i> ^{+/-} ; <i>Sfrp1</i> ^{-/-} ; <i>Sfrp2</i> ^{+/-} x <i>Sfrp1</i> ^{-/-}	83 (30)	73 (26)	60 (21)	65 (23)	281(100)

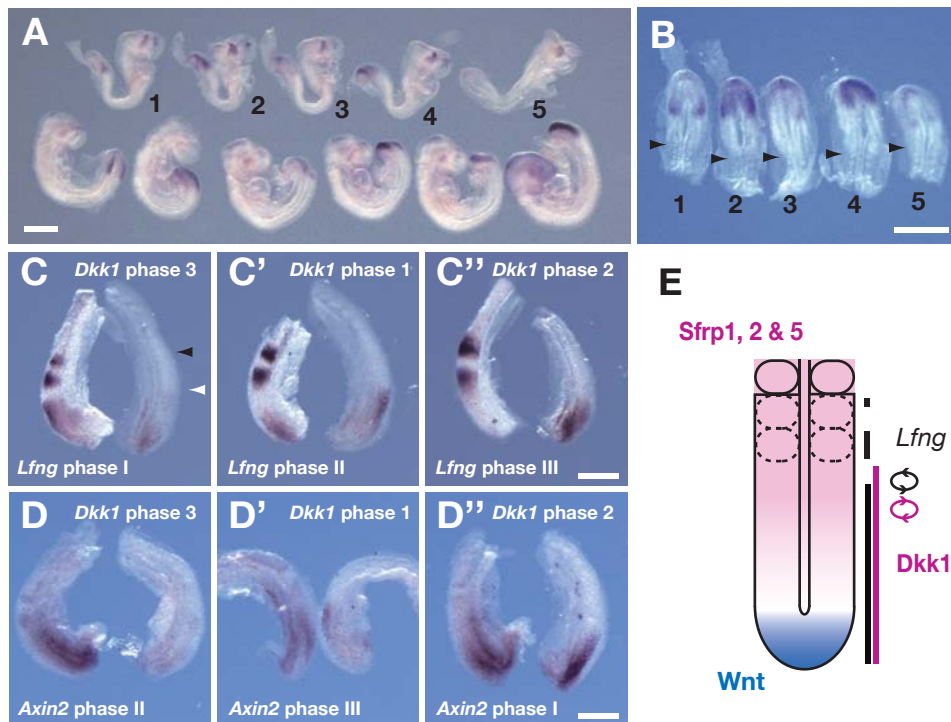


図 1 8、Dkk1 の発現は PSM で振動する。

(A、B) Dkk1 の振動性発現が胎齢 8.25 から 9.25 日胚の PSM で観察される。

(C-C'') PSM における振動性の Dkk1 発現は尾側半分で Lfng 発現の逆パターンを示す。

(D-D'') Dkk1 の発現は、尾側半分の領域における Axin2 の発現と異なる振動パターンを示す。

(E) PSM における Wnt と阻害因子の発現と分布の予想。

現の頭側境界は、新しく形成した体節の2体節分尾側に位置した(図18C-C'')。また、*Dkk1*発現の振動パターンはWnt制御下にある遺伝子*Axin2*の発現とは一致しない(図18D-D'')。一方、8から11体節期に相当する時期の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚においても*Dkk1*の発現振動が認められた。

胎齢9.5日の*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Dkk1*^{-/-}胚では、胚の反転が観察されず、前肢以降の領域における体節間境界が不明瞭になるなど、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚よりも重篤な表現型を示した(図19A-E')。さらに、*Tbx6*(Chapman et al., 1996)と*Dll1*の発現から、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Dkk1*^{-/-}胚のPSMが胎齢9.5日付近で著しい減少を示すことが示唆された(図21K-O)。しかし、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Dkk1*^{-/-}胚のPSMは、胎齢9.0日までは維持され(図21P-T)、胎齢8.5日胚では、単に、*Dkk1*^{-/-}胚の頭部欠損と*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚の尾側体軸短縮を合わせた表現型を示した(図21U-Y)。興味深いことに、*Sfrp1*^{-/-};*Dkk1*^{-/-}に*Sfrp2*ヘテロ接合型変異が加わる(*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Dkk1*^{-/-}胚)と、その個体数の半分(52%、n=25)で尾側領域体節の分節化異常が認められるようになった(図19A-E、A'、D'、E')。このように、表現型にばらつきが出るのは、個体間における遺伝学的な微妙な差異を反映したためと予想している(Leaf et al., 2006)。一方、これら*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Dkk1*^{-/-}胚の尾側領域においても、体節間境界の形成不全を観察した(図19D'、星印)。以上のことから、*Sfrps*と*Dkk1*によるWnt/ β -cateninの阻害が体節の分節化に必要であると考えられる。

*Sfrps*と*Dkk1*の多重変異胚における体節の分節化異常を遺伝子マーカーレベルで調べるために、13から19体節期(胎齢8.5日から8.75日)の*Dkk1*^{-/-}胚、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}胚、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における*Lfng*発現を解析した。この時期の*Dkk1*^{-/-}胚における*Lfng*の発現パターンと振動性周期はほぼ正常であった(図20G-I)。これに対し、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚においては、明白な振動性周期は観察できなかった(図20J、K)。一方、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}胚では、振動性周期はほぼ正常であったが、高い頻度で発現パターンの異常が観察された(55% ; n=18 ; 図20L-L')。同様に、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-}胚でも低頻度で発現パターンが変化しており(31% ; n=26)、このことは、体節形成への弱い影響を示唆する(図19C、H)。また、全ての組み合わせの多重変異胚における*Wnt3a*と*Fgf8*の発現が尾芽で観察された。以上の結果は、Wnt/ β -catenin経路を阻害する因子が体節の分節化に大きな効果を持っていることを示唆する。

胎齢9.5日の*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚では、体節における細胞分化が影響を受けた。一方、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚や*Dkk1*^{-/-}胚では、体節における細胞分化への影響は認められない。体節における筋節の分化は、*Myogenin*発現の低下から、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚において抑制されることが確認された(Edmondson and

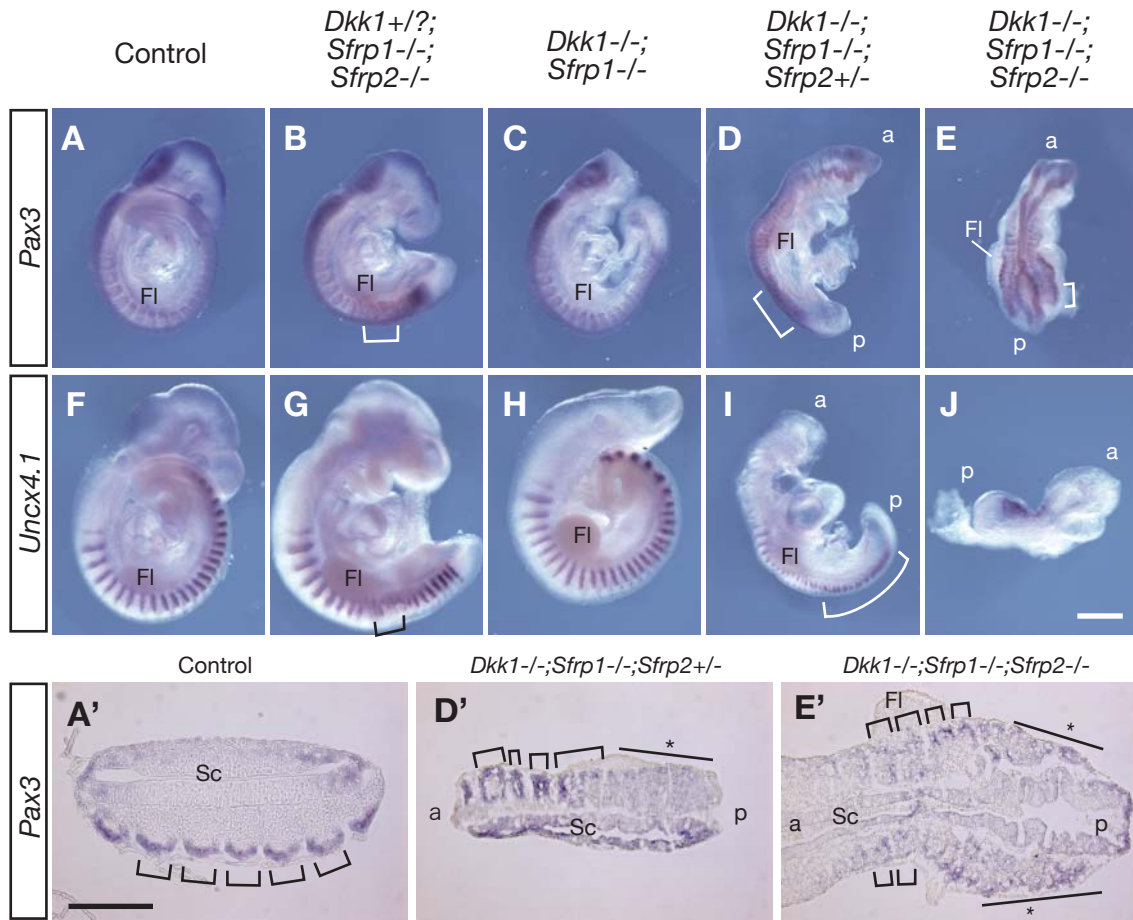


図 19、Wnt/ β -catenin 経路の阻害は体節の分節化に必要である

(A-J) 胎齢 9.5 日のコントロール胚 (*Dkk1*^{+/+} 胚もしくは *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/+} 胚、F)、*Dkk1*^{+/or+/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚 (B、G)、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-} 胚 (C、H)、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} 胚 (D、I)、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚 (E、J) における体節マーカー遺伝子、Pax3 (A-E)、Uncx4.1 (F-J) の発現を調べた。Pax3 と Uncx4.1 の発現は *Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} 胚 (D、I) と *Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚 (E、J) における異常な体節の分節化 (角括弧) を示す。スケールバー：500 μ m。

(A'、D'、E') *Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} 胚 (D') と *Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} 胚 (E') の切片はコントロール胚 (A') と比較して異常な体節形成 (*) を示唆する。スケールバー：200 μ m。Fl、前肢；a、頭側；p、尾側；SC、脊索。角括弧は体節一区分分を表す。

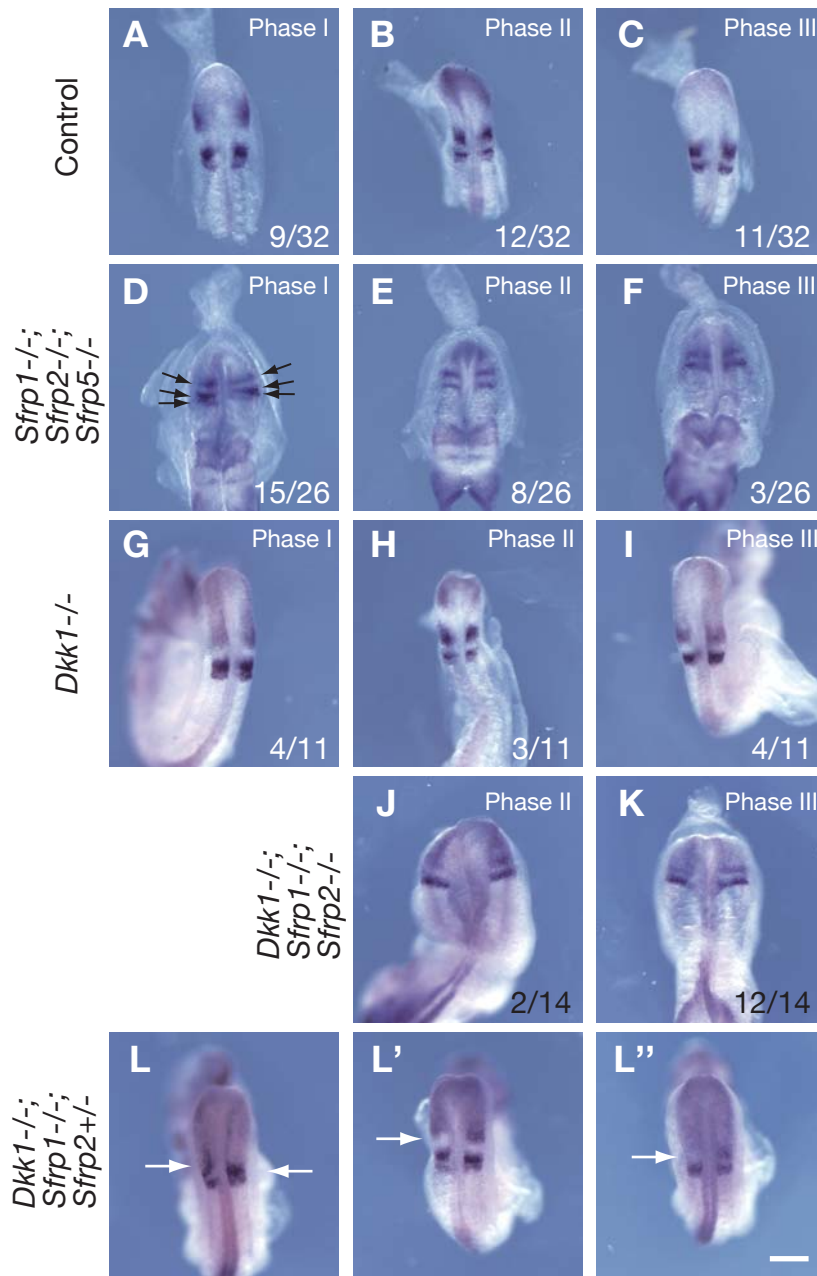


図 20、Lfng の周期的発現は Sfrps と Dkk1 の多重変異胚各種で変調する。

(A-C) 8 から 11 体節期の Lfng 発現はコントロール胚 ($Sfrp1^{-/-}; Sfrp5^{-/-}$ 胚または $Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{+/-}; Sfrp5^{-/-}$ の PSM で振動する。表の分数字は各 Phase の出現頻度を表す。

(D-F) 8 から 11 体節に相当する胚期の $Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{-/-}; Sfrp5^{-/-}$ 胚では振動周期が変調する。胚期は頭部の形態から判断した。

(G-I) 13 から 19 体節期の $Dkk1^{-/-}$ 胚での Lfng の発現は PSM で振動する。

(J, K) G-I と同時期の $Dkk1^{-/-}; Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{-/-}$ 胚の PSM では振動パターンが変化する。

(L-L'') 13 から 19 体節期に相当する胚期の $Dkk1^{-/-}; Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{+/-}$ 胚では、PSM における Lfng の振動性周期は明白に変化を示さないが、発現パターンが異常となった。矢印は PSM での Lfng の異常な発現パターンを示す。

スケールバー : 250 μ m。

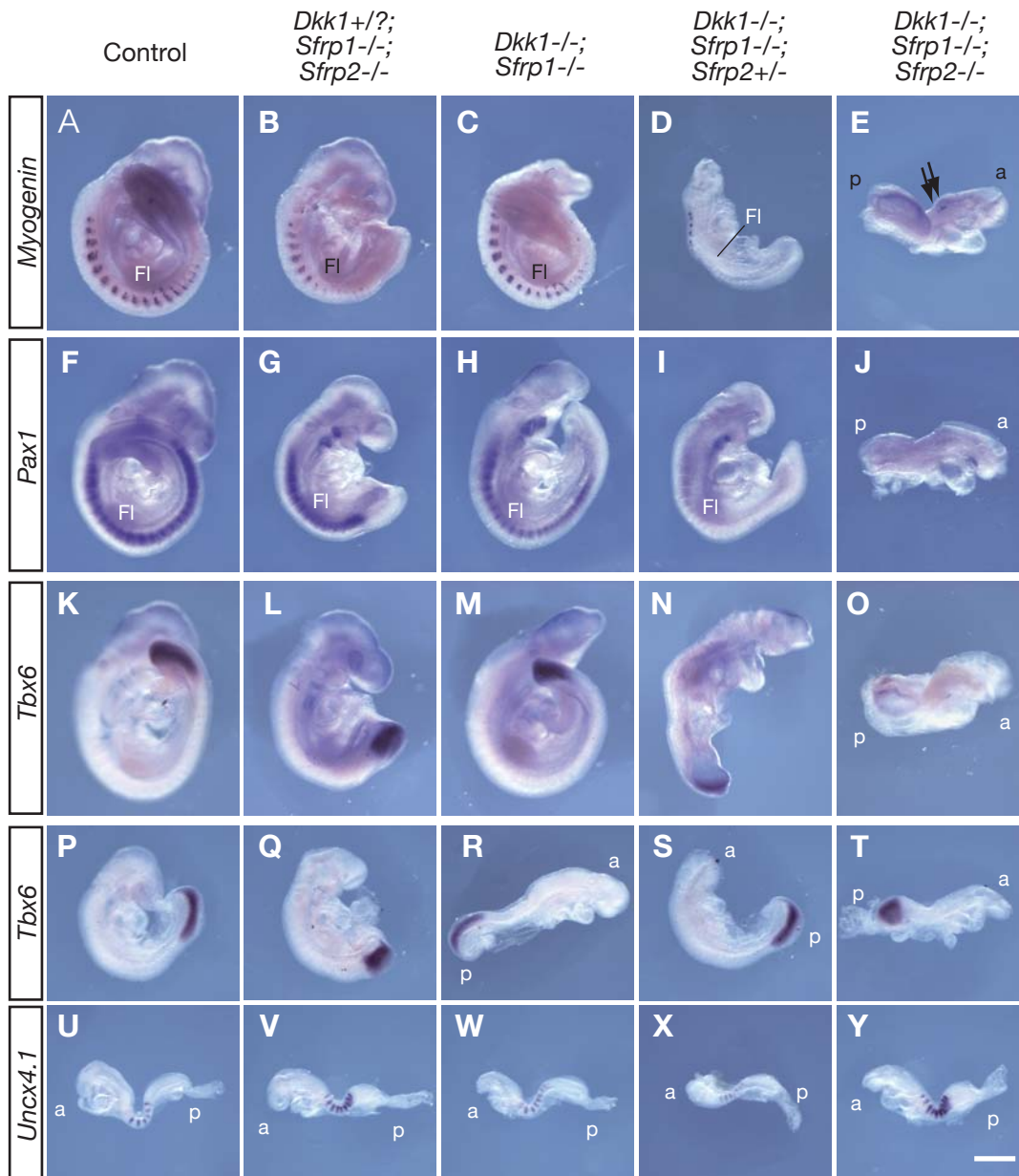


図 2 1、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Dkk1* 三重ホモ変異胚における体節分化と PSM の維持の低下。

(A-Y) 胎齢 8.5-9.5 日のコントロール胚 (*Dkk*^{+/+or-} ; *Sfrp1*^{-/-} ; *Sfrp2*^{+/+or-}、A、F、K、P、U)、*Dkk1*^{+/+or+} ; *Sfrp1*^{-/-} ; *Sfrp2*^{-/-} 胚 (B、G、L、Q、V)、*Dkk1*^{-/-} ; *Sfrp1*^{-/-} 胚 (C、H、M、R、W)、*Dkk1*^{-/-} ; *Sfrp1*^{-/-} ; *Sfrp2*^{+/-} 胚 (D、I、N、S、X)、*Dkk1*^{-/-} ; *Sfrp1*^{-/-} ; *Sfrp2*^{-/-} 胚 (E、J、O、T、Y) における体節マーカー遺伝子である Myogenin (A-E)、Pax1 (F-J)、Uncx4.1 (U-Y) と PSM マーカー遺伝子 Tbx6 (K-O、P-T) の発現を調べた。a、頭側。p、尾側。Fl、前肢。

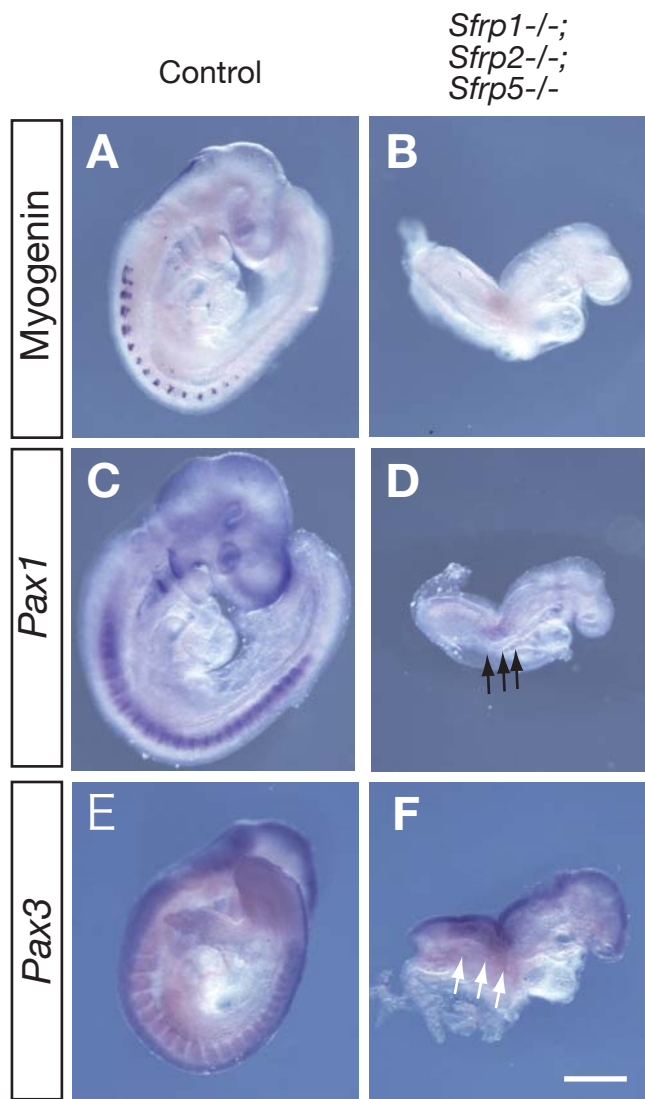


図 2 2、Sfrps 三重ホモ変異胚における筋節と硬節の分化抑制。

(A-F) Myogenin (A、B) と Pax1 (C、D) の発現によると、筋節と硬節への分化が影響される。一方、Pax3 (E、F) の強度の発現は三重ホモ変異胚でも観察される。

Olson., 1989)。しかし、微量の発現が頸部領域の数体節で見られ (図 2 1 E の矢印)、この領域は、胎齢 8.5 日における *Sfrp5* の発現領域に由来する (図 1 3 C)。*Pax1* の発現もまた、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚で低下した (図 2 1 J) (Capdevila et al., 1998)。この観察は、Wnt/ β -catenin 経路が硬節の分化を阻害するという過去の報告と一致する。一方で、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}胚における *Pax3* の発現が観察されたことから、皮筋節への分化は起きていることが示唆される (図 1 9 E)。さらに、*Sfrp1*^{-/-};*Dkk1*^{-/-} に *Sfrp2* へテロ接合型変異が加わる (*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-};*Dkk1*^{-/-}胚) と、個体数の約半分で *Pax1* と *Myogenin* の発現レベルが低下した (それぞれ n=5、図 2 1 D、I)。

同様の観察が胎齢 9.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚についても得られた。胎齢 9.5 日と 10.5 日の *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚では、*Myogenin* の発現が抑制される (図 2 2 A、B)、また、*Pax1* の発現も *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-}胚で低下した (図 2 2 C、D)。これら体節における分化マーカーを用いた解析から、*Sfrps* と *Dkk1* による Wnt/ β -catenin 経路の阻害は、体節の硬節と筋節への分化に必要であることが予想される。

考察

脊椎動物の体の繰り返し構造は体節に由来する。また、体節は未分節中胚葉から、頭尾体軸の伸長と協調して形成される。体節形成と頭尾体軸伸長の協調は、体幹部の正常な形成に不可欠と予想できるが、これらを結びつける機構はほとんど解明されていない。本研究の遺伝学的解析の結果を元に、*Sfrps* が体節形成と頭尾体軸伸長を結びつける機構に、何らかの役割を担うと予想する。

まず、*Sfrps* 多重変異体の解析から、*Sfrps* (*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*) 間では機能が重複することが示唆される。そして、*Sfrp1*、*Sfrp2* が、胸部領域の頭尾体軸伸長と体節形成に必要であることを示した。さらに、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の重複する機能として、神経管の閉鎖と中胚葉の収斂伸長の制御が予想された。*Sfrps* と Wnt 経路の関連を遺伝学的手法により解析した結果、*Sfrps* は、頭尾体軸伸長には PCP 経路を調節し、同時期の体節形成には Wnt/ β -catenin 経路を阻害することで示唆され、この作用を介して、*Sfrps* が体節形成と頭尾体軸伸長を結びつける役割を担うと考える。

頭部形成における Wnt 阻害因子の果たす役割

Sfrp1、*Sfrp2*、*Sfrp5* の発現は、胚発生の過程において重複する。例えば、*Sfrp1*

と *Sfrp5* の発現は、原腸胚の頭部オーガナイザー組織である Anterior visceral endoderm (AVE) で重複する (図 1 2 A、B、H、I) (Hoang et al, 1998)。同じ時期の *Sfrp2* の発現も、微弱に embryonic ectoderm で見られる (図 1 2 E)。しかし、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5* の三重ホモ変異胚では、原腸胚期以降の頭部形成に目立った異常は観察されなかった。頭部誘導に関する Sfrps の機能は、AVE で発現する分泌性 Wnt 阻害因子 *Dkk1* によって相補されている可能性が考えられる (Mukhopadhyay et al., 2001)。今後、マウスの頭部形成における Wnt シグナルの阻害が果たす役割を解明するため、*Sfrp1*、*Sfrp2*、*Sfrp5*、*Dkk1* の四重ホモ変異胚の作製による機能解析が期待される。

Sfrps による頭尾体軸伸長の制御

Sfrps の三重ホモ変異胚は、胎齢 9.5 日目において、神経管の閉鎖不全、頭尾軸伸長不全が認められ、これより以前の胎齢 7.5 日胚では、中軸中胚葉の分布異常が観察された。これらの表現型は、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュで観察されている収斂伸長異常に類似した。アフリカツメガエルやゼブラフィッシュにおいて、収斂伸長が Wnt/PCP 経路によって調節されることは、すでに確立されている (Torban et al., 2004)。そこで、マウス PCP 構成因子 *Vangl2* に変異を有する *Lp* マウスを用いた多重変異体による解析を行ったところ、*Sfrp* と *Vangl2* との遺伝学的な相互作用が明らかとなり、Sfrps が PCP 経路を調節することが示唆された。マウスにおいて、*Vangl2* の発現は、原腸胚から咽頭胚初期において、沿軸中胚葉、神経外胚葉で観察される (Kibar et al., 2001)。しかし、Sfrps がどのように PCP 経路の調節を行うのか、*Vangl2* とどのように関わるのかについて、分子レベルの説明を与える情報はない。今のところ、PCP 経路に関わる Wnt リガンド自体は、はっきり同定されていない。また、*Vangl2* は、膜タンパク質であるが、構造上リガンドに対する受容体として機能するとは考えにくい (Kibar et al., 2001)。一方、Sfrps が直接、Wnt 受容体 Frizzled と結合することも示されている (Bafico et al., 1999)。Frizzled3、Frizzled6 が収斂伸長を調節することから (Wang et al., 2006)、Sfrps、Frizzled3、Frizzled6、*Vangl2* が分子レベル、遺伝学的レベルでどういう関係にあるのかについての解析が急務であると考えられる。

Sfrps と体節形成

体節の分節化には、PSM (未分節中胚葉) における Notch 関連振動性遺伝子の周期的な発現と Wnt3a の濃度勾配が必要である (Aulehla et al., 2003 ; Saga and Takeda, 2001; Bessho et al., 2001)。これまでに、*Lfng*、*Her1*、*chairy1*、*hairy2*、

Hes1/Hes2、*Hes7* のような多くの Notch 関連の振動性遺伝子が同定されてきた。実際、*Notch*、*Dll1*、*Dll3*、*Lfng*、*Hes7* の変異胚は体節不整を示す (Saga and Takeda, 2001; Bessho et al., 2001)。Notch 関連振動性遺伝子の発現は、*Wnt3a* 変異胚において欠損する (Aulehla et al., 2003)。これは、Wnt が Notch の上流で制御することを示唆する。最近の報告により、Wnt/ β -catenin 経路の下流転写因子である Lef/Tcf が Notch リガンド *Dll1* の発現を活性化することが示され、Wnt と Notch の関連が推定された (Hofmann et al., 2004; Galceran et al., 2004)。以上より、*Sfrp1*、*Sfrp2* の二重ホモ変異胚で見られる体節の分節化異常は、*Lfng*、*Hes7* の周期的発現が変調をきたすことと関連すると予想される。また、胎齢 8.5 日の *Sfrp1*、*Sfrp2* の二重ホモ変異胚では、尾芽における脱リン酸化 β -catenin が上昇し、Wnt/ β -catenin 経路の下流で調節を受ける *Nkd1* の周期的な発現も変調する。

Dkk1 は共受容体 LRP5/6 に結合することで Wnt/ β -catenin 経路を特異的に阻害する。*Dkk1* ホモ変異体では、軽度の仙椎融合が認められる (MacDonald et al., 2004)。また、私の研究により、*Dkk1* は体節形成期に PSM で振動性の発現を示すことが明らかになった。*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}胚は正常であるが、*Dkk1* 変異単独でも体節形成に異常のない胚期に、*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-}胚は、体節不整と Notch 関連遺伝子の発現パターンの異常を示した。これらのことから、Sfrps は、*Dkk1* とともに Wnt/ β -catenin 経路を阻害し、Notch シグナルを介することで体節の分節化に関与する可能性が示唆された。

体幹部パターン形成における Sfrps の役割

将来体節となる沿軸中胚葉は、原腸陥入が始まる early bud 期までに原条から形成される (図 2 3、左図の PS の側面方向への黒矢印) (Kinder et al., 1999)。同時期に中軸中胚葉もまた形成され、陥入する (図 2 3、左図の正中線に沿った黒矢印) (Kinder et al, 2001)。Late bud 期から early head fold 期までに、連続して、沿軸中胚葉は結節近傍に配置される。その後、体節形成が開始されるが、沿軸中胚葉は原条において継続して生成され、PSM に付加される。一方、中軸・沿軸中胚葉が形成された直後に、PCP 構成因子の変異体では収斂伸長の異常を示す。このことは、沿軸、中軸中胚葉が形成された後、収斂伸長が始まることを示唆する (図 2 3、中央図、右図の赤矢印)。一般的に、原腸期の収斂伸長は、体節と原条の間を含む体軸全体の長さに影響する (Park and Moon, 2002; Wang et al., 2006)。また、尾芽から PSM の頭側までの距離は、*Wnt3a* と *Fgf8* の濃度勾配により決定されると考えられている (Aulehla et al., 2003 ; Dubrulle and Pourquie, 2004)。同時に、PSM における Wnt/Fgf の濃度勾配が、適切な形で形成されることは、体節形成の継続に不可欠に違いない。

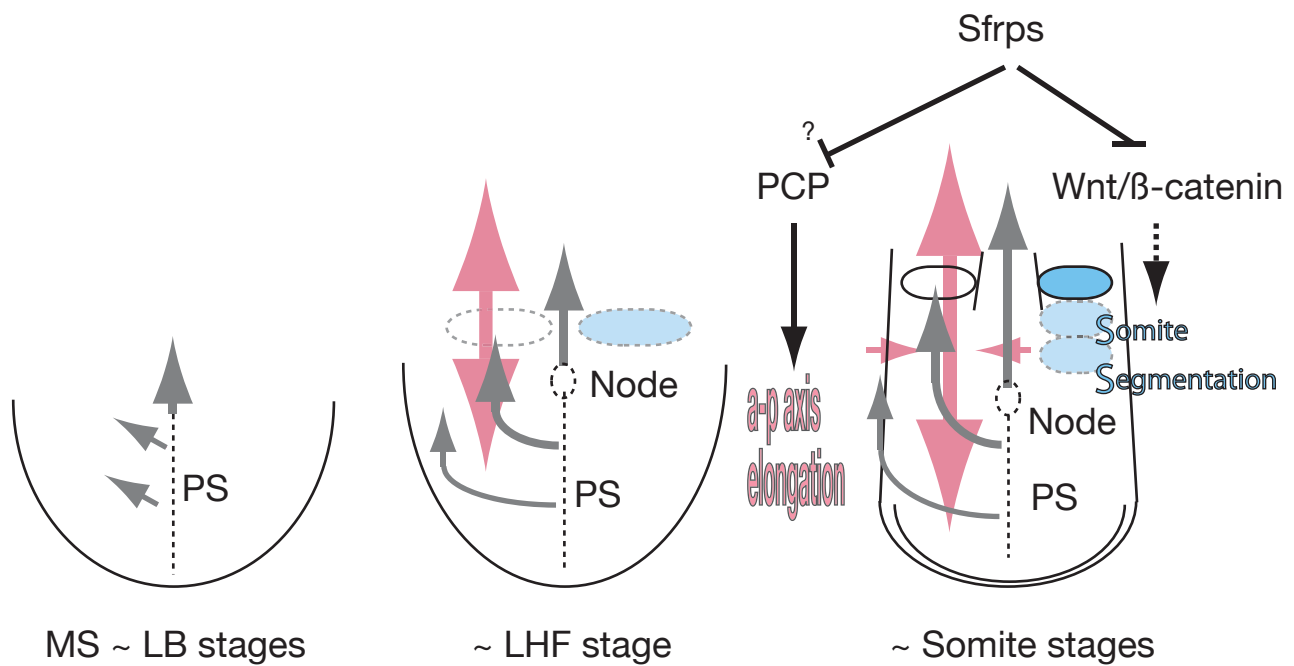


図 2 3、Sfrps が体幹部で果たす役割。

Sfrps が頭尾体軸伸長と体節の分節化を制御するモデル。まず、mid s streakから late bud 期に、原条で中軸、沿軸中胚葉が形成し、頭尾軸方向に陥入を開始する（左図、正中線に沿った黒矢印が中軸中胚葉、側方黒矢印が沿軸中胚葉を示す）。Late head fold 期までに、中胚葉が収斂伸長を始める（中央図、赤矢印）と同時に、最初の体節の分節化が生じる位置が決定する（中央図、薄青の円）。体節が形成され始める時期には、PCP 経路による収斂伸長（右図、赤矢印）と Wnt/canonical 経路（右図）による体節の分節化が行われる。Sfrps がそれぞれの Wnt 経路を同時に調節することで体軸伸長と体節形成を結び付けていると予想する。

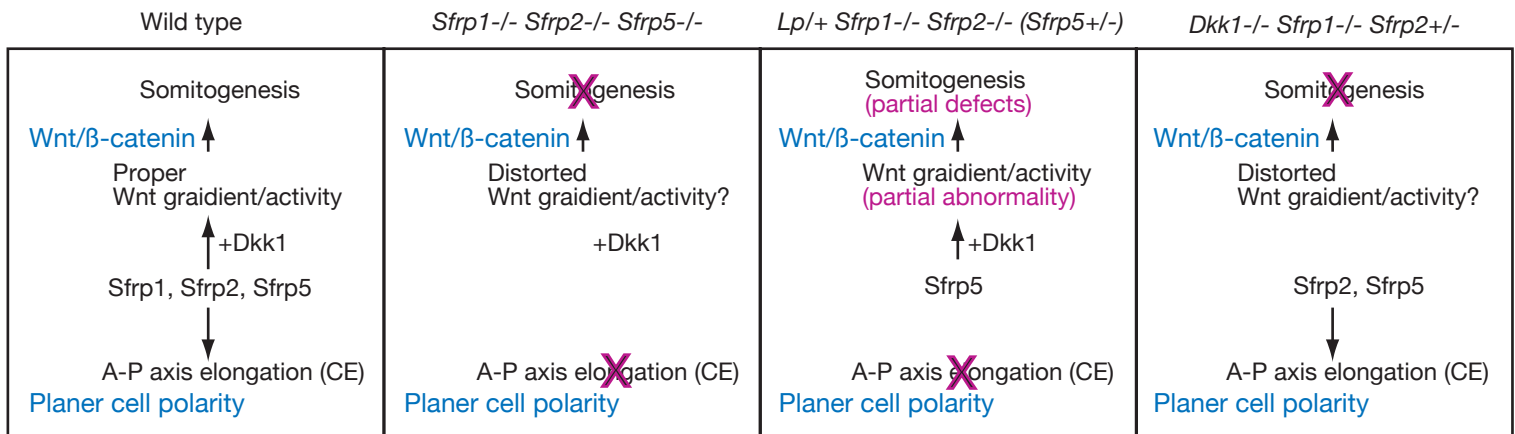


図 2 4、遺伝学的解析のまとめ

野生型の尾側領域では、体節形成について、Wnt/ β -catenin 経路の正常な濃度・活性勾配が、Sfrps (*Sfrp1*, *Sfrp2*, *Sfrp5*) と *Dkk1* によって形成される。収斂伸長による頭尾体軸伸長については、Sfrps によって PCP 経路が調節されると考えられる (Wild type)。一方、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{-/-} 胚では、Sfrps の制御が欠損するため、*Dkk1* は残るが、体節形成、頭尾体軸伸長ともに異常となる。*Lp*^{+/+};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-};*Sfrp5*^{+/-} 胚では、*Dkk1* と半分の *Sfrp5* が存在しているため、*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} と同様、体節形成に関して一部の異常に留まる。しかし、体軸伸長については、Sfrps に加えて PCP 経路に特異的な分子 *Vangl2* (*Ltap*) が欠損するために、表現型が現れるレベルまでシグナル調節が異常となる。*Dkk1*^{-/-};*Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} 胚では、Sfrps と Wnt/ β -catenin 経路を特異的に阻害する *Dkk1* の活性がなくなるので、正常な Wnt の濃度・活性勾配が形成されず、体節形成が異常を示す。一方、体軸伸長に関する PCP 経路は、*Sfrp2* と *Sfrp5* の活性が存在するために、ほとんど影響を受けないと予想される。

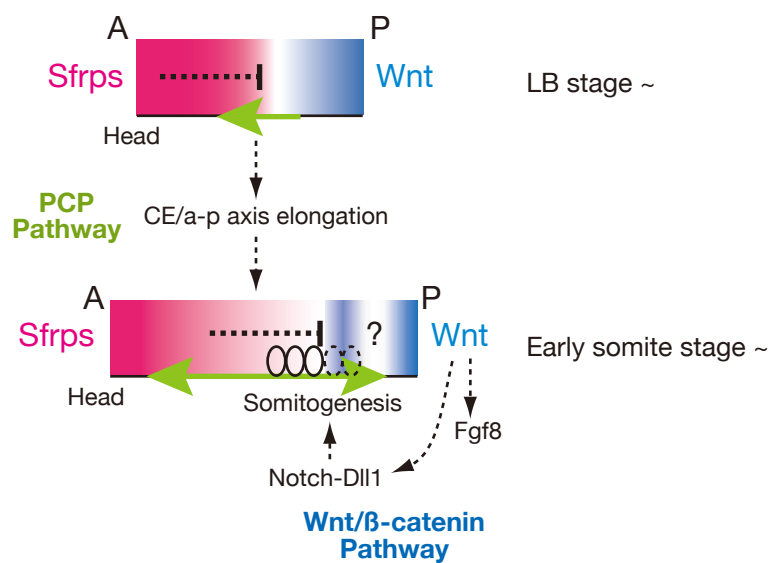


図 2 5、Sfrps の役割。

Sfrps は、late bud 期以降に PCP 経路を調節して収斂伸長を介した頭尾体軸の伸長に関連する。このことが、Sfrps 自らの濃度勾配に影響し、これによって、尾芽からの Wnt/ β -catenin 経路に関わるリガンドの濃度勾配の調節、もしくは活性化領域の制限を介して、体節形成に関連すると予想される。これらの作用によって、Sfrps が頭尾体軸の伸長と体節の形成を協調させる役割を担うと想定される。

私の遺伝学的解析の結果は、Sfrps が Wnt/PCP 経路を調節していることを示した。この調節を介して、Sfrps は、頭尾体軸伸長に関わると予想する。また、Sfrps が Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、体節形成に関わることも示された。、胎齢 7.5-9.5 日胚の頭側から尾側に向かう Sfrps の減衰する濃度勾配は、PSM における Wnt の濃度勾配を調節し、または、活性領域を限定していると予想する (図 2 5)。Sfrp のこの二重の役割は、体節形成と頭尾軸伸長の関連に、重要な影響を及ぼす。実際に、Sfrps の三重ホモ変異胚では、収斂伸長、体節形成、いずれも異常となる (図 2 4)。しかし、*Lp/+ ; Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{-/-}; Sfrp5^{+/-}*胚においても、収斂伸長の異常は観察されたが、体節形成は、*Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{-/-}*胚と比べ変わらなかった (図 2 4)。また、*Dkk1^{-/-}; Sfrp1^{-/-}; Sfrp2^{+/-}*胚は、体節形成に異常を示したが、中胚葉の収斂伸長には影響しなかった (図 2 4)。これらのことは、Wnt/ β -catenin 経路と PCP 経路、それぞれの調節活性を落とした状態で、Sfrp 変異の影響が表れること、Sfrps のそれぞれの経路の調節が、相互に依存せず行われていることを意味する。また、Sfrps が同時期に Wnt/ β -catenin 経路と PCP 経路を調節することで頭尾体軸伸長と体節形成を協調させる役割を担っていると予想する。

謝辞

本研究は、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターのボディプラン研究グループにおいて相澤慎一教授の下で行われました。相澤先生には、多方面から助けていただきました。ボディプラン研究グループ秘書の佐井藤さんをはじめ、研究員、テクニカルスタッフ、学生には、事務や実験に関してお世話になりました。高橋淑子教授には、奈良先端科学技術大学院大学における主指導教官になっていただきました。また、松山誠博士には、実験や生活に関して助言をいただきました。最後に、下野明彦博士には、実験全般に関して未熟な私に対して根気よく指導していただきました。

以上の方々にこの場を借りて深くお礼を申し上げます。

参考文献

Agathon, A., Thisse, C., and Thisse, B. (2003). The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* 424, 448-452.

Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., and Herrmann, B.G. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395-406.

Aulehla, A., and Herrmann, B., G. (2004). Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes Dev.* 18, 2060-2067.

Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P.W., Yaniv, A. and Aaronson, S.A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 274,16180 -16187.

Barrow, J.R., Thomas, K.R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M.R., and McMahon, A.P. (2003). Ectodermal Wnt3/ β -catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev.* 17, 394-409.

Beddington, R.S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-620.

Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* 15, 2642-2647.

Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., and Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Dev.* 17, 1451-1456.

Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J.L., and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121, 2407-2418.

Bodine, P.V., Zhao, W., Kharode, Y.P., Bex, F.J., Lambert, A.J., Goad, M.B., Gaur, T., Stein, G.S., Lian, J.B., and Komm, B.S. (2004). The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* 18, 1222-1237.

Candia, A.F., Hu, J., Crosby, J., Lalley, P.A., Noden, D., Nadeau, J.H., and Wright, C.V. (1992). Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. *Development* 116, 1123-1136.

Carreira-Barbosa., F., Concha, M., L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.,W., and Tada, M. (2003). Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development* 130, 4037-4046.

Capdevila, J., Tabin, C. and Johnson, R.L. (1998). Control of dorsoventral somite patterning by Wnt-1 and beta-catenin. *Dev Biol.* 193, 182-194.

Chadee, D.N., Taylor, W.R., Hurta, R.A., Allis, C.D., Wright, J.A., and Davie, J.R. (1995). Increased phosphorylation of histone H1 in mouse fibroblasts transformed with oncogenes or constitutively active mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 270, 20098-20105.

Chapman, D.L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L. M., and Papaioannou, V., E. (1996) Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol.* 180, 534-542.

Cole, S.E., Levorse, J.M., Tilghman, S.M., and Vogt, T.F. (2002). Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Dev Cell* 3, 75-84.

Correia, K.M., and Conlon, R.A. (2000). Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of somites. *Mech Dev.* 91, 19-30.

Corson, L., B., Yamanaka, Y., Lai, K., M., and Rossant, J. (2003). Spatial and temporal

patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130:4527-4537.

Cox, S., Smith, L., Bogani, D., Cheeseman, M., Siggers, P. and Greenfield, A. (2006) Sexually dimorphic expression of secreted frizzled-related (SFRP) genes in the developing mouse Mullerian duct. *Mol Reprod Dev.* 73, 1008-1016.

Curtin, J.A., Quint, E., Tshipouri, V., Arkell, R. M., Cattanach, B., Copp, A. J., Henderson, D.J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E. M. et al. (2003). Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr. Biol.* 13,1129 -1133.

Dennis, S., Aikawa, M., Szetom W., d'Amore, P., A., and Papkoff, J. (1999). A secreted frizzled related protein, *FrzA*, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci.* 112, 3815-3820.

Dodd, J., Morton, S.B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., and Jessell, T.M. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1, 105-116.

Downs, M., K. and Davies, T. (1993). Staging of gastrulating embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255-1266.

Dubrulle, J. and Pourquié, O. (2004). Coupling segmentation to axis formation. *Development* 131, 5783-5793.

Dubrulle, J. and Pourquié, O. (2004). *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427, 419-422

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.

Edmondson, D.G., and Olson, E.N. (1989). A gene with homology to the *myc* similarity region of *MyoD1* is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628-640.

Evrard, Y.A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L., and Johnson, R.L. (1998). Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* 394, 377-381.

FANTOM Consortium, Carninci P, et al. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566

Finley, K.R., Tennessen, J., and Shawlot, W. (2003). The mouse secreted frizzled-related protein 5 gene is expressed in the anterior visceral endoderm and foregut endoderm during early post-implantation development. *Gene Expr Patterns* 3, 681-684.

Forsberg, H., Crozet, F., and Brown, N.A. (1998). Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol.* 8, 1027-1030.

Galceran, J., Sustmann, C., Hsu, S.C., Folberth, S., and Grosschedl, R. (2004). LEF1-mediated regulation of Delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis. *Genes Dev.* 18, 2718-2723.

Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signaling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519.

Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R., and Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10, 1135-1147.

Guo, X., Day, T. F., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L., and Yang, Y. (2004). Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18, 2404-2417.

Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.

Hérault, Y., Beckers, J., Kondo, T., Fraudeau, N., and Duboule, D. (1998). Genetic analysis of a Hoxd-12 regulatory element reveals global versus local modes of controls in the HoxD complex. *Development* 125, 1669-1677.

Hoang, B.H., Thomas, J.T., Abdul-Karim, F.W., Correia, K.M., Conlon, R.A., Luyten, F.P. and Ballock R.T. (1998). Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev Dyn.* 212, 364-372.

Hofmann, M., Schuster-Gossler, K., Watabe-Rudolph, M., Aulehla, A., Herrmann, B.G., and Gossler, A. (2004). WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev.* 18, 2712-2717.

Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35, 255-265.

Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431-436.

Ishikawa, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kokubo, H., Kanno, J., Inoue, T., and Saga, Y. (2004). Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev.* 121, 1443-1453.

Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., and Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signaling. *Development* 130, 4295-4305.

Jones, S.E., and Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays.* 24, 811-820.

Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway.

J Cell Sci. 116, 2627-2634.

Kelly, O.G., Pinson, K.I., and Skarnes, W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131, 2803-2815.

Kiber, Z., Vogan, K.J., Groulx, N., Justice, M.J., Underhill, D.A. and Gross, P. (2001). Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet.* 28, 251-255.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Quinlan, G.A., Hadjantonakis, A., Nagy, A. and Tam, P.P.L. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126, 4691-4701.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Wakamiya, M., Sasaki, H., Behringer, R.R., Nagy, A. and Tam, P.P.L. (2001). The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 128, 3623-3634.

Kühl M. (2002). Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin Cell Dev Biol.* 13, 243-249.

Leaf, I., Tennessen, J., Mukhopadhyay, M., Westphal, H. and Shawlot, W. (2006). *Sfrp5* is not essential for axis formation in the mouse. *Genesis* 44, 573-578.

Lee, C.S., Buttitta, L.A., May, N.R., Kispert, A., and Fan, C.M. (2000). SHH-N upregulates *Sfrp2* to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm. *Development* 127, 109-118.

Leimeister, C., Bach, A., and Gessler, M. (1998). Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family. *Mech Dev.* 75, 29-42.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (1997). *Frzb-1* is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.

Li, Z.L., and Shiota, K. (1999). Stage-specific homeotic vertebral transformations in mouse fetuses induced by maternal hyperthermia during somitogenesis. *Dev Dyn.* 216, 336-348.

Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M., J., Albrecht, U., Behringer, R., R., and Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet.* 22, 361-365.

Lu, X., Borchers, A.G., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J.C. and Tessier-Lavigne, M. (2004). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430, 93-98.

MacDonald, B.T., Adamska, M. and Meisler, M.H. (2004). Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* **131**, 2543-2552.

McMahon, A.P. and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.

Mansouri, A., Yokota, Y., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P. (1997). Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. *Dev Dyn.* 210, 53-65.

Maruoka, Y., Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Itoh, N., Hogan, B.L., and Furuta, Y. (1998). Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mech Dev.* 74, 175-177.

Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 13636-13641.

Morales, A.V., Yasuda, Y., and Ish-Horowicz, D. (2002). Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to notch signaling. *Dev Cell* 3, 63-74.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Niehrs, C., Belmonte, J.C., and Westphal, H. (2001). *Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. 1, 423-434.

Mukhopadhyay, M., Teufel, A., Yamashita, T., Agulnick, A.D., Chen, L., Downs, K.M., Schindler, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Dorward, D., and Westphal, H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development* 130, 495-505.

Murdoch, J. N., Doudney, K., Paternotte, C., Copp, A. J. and Stanier, P. (2001). Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2593 -2601.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaka, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.*, 20, 87-90.

Neubuser, A., Koseki, H., and Balling, R. (1995). Characterization and developmental expression of *Pax9*, a paired-box-containing gene related to *Pax1*. *Dev Biol.* 170, 701-716.

Niehrs, C. (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* 15, 314-319.

Park, M. and Moon, R.T. (2002). The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol.* 4, 20-25.

Perea-Gomez, A., Vella, F.D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., Behringer, R.R., and Ang, S.L. (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* 3, 745-756.

Robert, B., Sassoon, D., Jacq, B., Gehring, W. & Buckingham, M. (1989) *Hox-7*, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis.

EMBO J. 8, 91-100

Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C, Ruiz J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. and Bovolenta, P. (2005) SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci.* 8. 1301-1310.

Rossel, M., and Capecchi, M.R. (1999). Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126, 5027-5040.

Rosso, S., B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A., and Salinas, P., C. (2005). Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci.* 8, 34-42.

Saga, Y., and Takeda, H. (2001). The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat Rev Genet.* 2, 835-845.

Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S. and Shimono, A. (2006). *Sfrp1* and *Sfrp2* regulate anteriorposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989-999.

Seidensticker, M.J., and Behrens, J. (2000). Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1495, 168-1682.

Semënov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kuhl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer *Dickkopf-1* is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol.* 26, 951-961.

Serth, K., Schuster-Gossler, K., Cordes, R. and Gossler, A. (2003). Transcriptional oscillation of *lunatic fringe* is essential for somitogenesis. *Genes Dev.* 17, 912-925.

Shawlot, W., and Behringer, R.R. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.

Shawlot, W., Wakamiya, M., Kwan, K.M., Kania, A., Jessell, T.M., and Behringer, R.R. (1999). *Lim1* is required in both primitive streak-derived tissues and visceral endoderm

for head formation in the mouse. *Development* 126, 4925-4932.

Shimono, A., and Behringer, R.R. (1999). Isolation of novel cDNAs by subtractions between the anterior mesendoderm of single mouse gastrula stage embryos. *Dev. Biol.* 209, 369-380.

Shimono, A., and Behringer, R.R. (2000). Differential screens with subtracted PCR-generated cDNA libraries from subregions of single mouse embryos. *Methods Mol. Biol.* 136, 333-344.

Shimono, A., and Behringer, R. R. (2003). Angiomotin regulates visceral endoderm movements during mouse embryogenesis. *Curr. Biol.* 13, 613-617.

Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R.R., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B. 3rd., and Birchmeier, W. (2003). Genetic interaction between Wnt/ β -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev.* 17, 1963-1968.

Suzuki, H., Watkins, D. N., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Markowitz, S. D., Dong Chen, W., Pretlow, T. P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet.* 36, 417-422.

Takada, S., Stark, K.L., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8, 174-189.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.* 162, 899-908.

Torban, E., Kor, C. and Gros, P. (2004). Van Gogh-like2(Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet.* 20, 570-577.

Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* 133, 1123-1137.

Ulrich, F., Concha, M.L., Heid, P.J., Voss, E., Witzel, S., Roehl, H., Tada, M., Wilson, S.W., Adams, R.J., Soll, D.R., and Heisenberg, C.P. (2003). *Slb/Wnt11* controls hypoblast cell migration and morphogenesis at the onset of zebrafish gastrulation. *Development* 130, 5375-5384.

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

Wang, J., Hamblet, N.S., Mark, S., Dickinson, M.E., Brikman, B.C., Segil, N., Fraser, S.E., Chen, P., Wallingford, J.B. and Wynshaw-Boris, A. (2006) Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133, 1767-1778.

Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., and Moos, M. Jr. (1997). *Frzb*, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757-766.

Wang, Y., Guo, N. and Nathans, J. (2006). The role of *Frizzled3* and *Frizzled6* in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J. Neurosci.* 26,2147 -2156.

Westfall, T., A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M., and Slusarski, D., C. (2003) *Wnt-5/pipetail* functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol.* 162. 889-898.

Widelitz, R. (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors* 23, 111-116.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the

mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-659.

Wilkinson, D.G. (1992). In *Situ Hybridization*, (Wilkinson D. G. ed.) pp. 75-83. IRL Oxford

Wilson, V., Rashbass, P., and Beddington, R. S. (1993). Chimeric analysis of T (Brachyury) gene function. *Development* 117, 1321-131.

Xu, Q., D'Amore, P., A., and Sokol, S., Y. (1998). Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist. *Development*. 125, 4767-4776.

Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tametomo, H., Kohmura, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S. (1993). A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal Biochem*. 214, 77-86

Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P., and Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126, 1211-1223.

Yamaguchi, T., P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., and McMahon AP. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*. 13, 3185-3190.

Yamaguchi, T.P. (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr. Biol*. 11, R713-724.

Yan, D., Wallingford, J., B., Sun, T., Q., Nelson, A., M., Sakanaka, C., Reinhard, C., Harland, R., M., Fantl, W., J., and Williams, L., T. (2001). Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 3802-3807.

Yoshikawa, Y., Fujimori, T., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev Biol*. 183, 234-242.

Yoshino, K., Rubin, J.S., Higinbotham, K.G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S.Y., and Perantoni, A.O. (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mech Dev.* 102, 45-55.