

後期神経堤細胞における  
時空間特異的な遺伝子操作法の確立

2011

横田 泰宏

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

## 目次

序論.....	3
方法と材料.....	8
結果.....	15
考察.....	61
謝辞.....	72
参考文献.....	73

所属 (主指導教員)	分子発生生物学講座 (高橋 淑子教授)		
氏名	横田 泰宏	提出	平成 22 年 12 月 21 日
題目	後期神経堤細胞における時空間特異的な遺伝子操作法の確立		

脊椎動物において、神経堤細胞(Neural crest cell, 以下 NCC)は末梢神経系を始めとする数多くの組織／細胞種を生む極めて重要な細胞である。胚発生期において、NCC は神経管の背側上端にその前駆細胞が運命づけられ、神経管から遊出する。そして発生後期になると、胎内をダイナミックに移動したあと、所定の部位において分化・形態変化する。これまで、NCC の研究には、胚操作の容易なニワトリ胚が有用なモデル生物として頻りに用いられてきた。ニワトリ胚では、遺伝子機能を解析する強力な手法として、*in ovo* エレクトロポレーション法が確立されている。しかしながら、従来の手法では、NCC 以外の運動神経をふくむ脊髄にも外来遺伝子は発現される。また、その発現は NCC 発生後期まで持続しない。これらの問題を解決するため、本研究では NCC 発生後期の解析に向けて、2つの新規遺伝子操作法を確立したのでここに報告する。

#### ①NCC 時期空間特異的な遺伝子発現法の確立

NCC の研究では、胚操作の容易性からニワトリ胚が、頻りに用いられてきた。ニワトリ胚では、簡便な遺伝子操作法として *in ovo* エレクトロポレーション法が確立されている。これまで、NCC の遺伝子操作では、プラスミド溶液を NCC が湧出する前の神経管に注入し電気パルスを与える方法がとられてきた。ところが、従来の方法では、もっぱら恒常活性型プロモーター(CAGGS)が用いられてきたため、遺伝子は NCC のほか神経管にも発現される。また、細胞分裂によるプラスミドの減少から、発生後期の NCC に遺伝子を発現させることが困難であった。そこで、本研究では、NCC 発生後期の分子メカニズムの解明を見据え、NCC 時期空間特異的な遺伝子操作法の確立を試みた。まず、発生後期の NCC に遺伝子を発現させるには、近年、当研究室で確立された永続的に遺伝子を発現させる Tol2 法が有効であることを示した。しかし、Tol2 法では、CAGGS が使われるため、NCC 由来組織以外にも遺伝子の発現が見られた。そこで NCC 特異的に遺伝子を発現させるため、全ての NCC に特異的に発現する *Sox10* に注目し、そのエンハンサーの単離を試みた。エンハンサーの単離を効率よく行うため、*Sox10* の全 ORF を含む約 36kb のニワトリゲノム領域を *in silico* によりヒトのゲノムと比較解析すると、7つの非コード保存配列が見いだされた。これらの配列を含むゲノム断片をレポータープラスミド(ptk-EGFP ベクター)に挿入し *in ovo* エレクトロポレーション法によりエンハンサー活性を検証した。

これより、*Sox10* エンハンサーの 5' 上流に 3.6kb のエンハンサー配列を見いだした。しかし、発生後期における *Sox10* エンハンサーの活性を Tol2 法により検討したところ、その活性は NCC 由来組織／細胞種では認められなかった。一度でも *Sox10* エンハンサーが活性化した NCC において遺伝子の発現を誘導させ続けるため、Cre/loxP 法に着目し、これと *Sox10* エンハンサーを併用した。これより、発生後期の E7 において、遺伝子(EGFP)の発現が NCC 由来組織／細胞種に局限して見られた。よって、NCC 特異的かつ長期的に遺伝子を発現させる技術が確立された。さらに、次期特異的に遺伝子进行操作するため、薬剤(doxycycline, 以下 Dox)で遺伝子の発現を誘導させる tet-on 法を併用した。その結果、Dox の投与に応じて、EGFP の発現が E7 の NCC 由来組織／細胞種に局限して見られた。これより、NCC 由来組織／細胞種において、Dox の投与により遺伝子の発現を誘導する技術が確立された。これらの技術は、発生後期の NCC の研究に有用となることが期待される。

## ②皮膚性感覚神経の区画形成を解析する遺伝子操作方法の確立

ヒトを始めとする脊椎動物には、圧力や温度などの外的刺激を感受する皮膚感覚が備わっており、体表に張り巡った NCC 由来細胞種の 1 つである感覚神経(以下、皮膚性感覚神経と記述する)がその機能を支えている。皮膚性感覚神経の細胞体は頭尾軸に沿って脊椎の脇に分節状に並ぶ後根神経節(Dorsal root ganglion, 以下 DRG)に位置し、そこから軸索を表皮へと伸ばす。興味深いことに、それぞれの DRG に由来した皮膚性感覚神経網は、体表において特定の領域を支配しており、ほとんど互いに重なり合うことのない区画を形成する。これまで、皮膚性感覚神経の軸索が DRG から体表へと伸長し、神経網の形成が表皮の直下に局限される機構においては理解がなされてきた。しかしながら、皮下におけるこの神経軸索の区画が、どのような分子機構で形成されるのかは、ほとんど明らかにされていない。

本研究では、皮膚性感覚神経区画化の分子機構を解明するため、生体内における実験系の確立を試みた。これにあたり、技術的に皮膚性感覚神経の観察が容易なニワトリ胚の胴体部に着目した。胴体部の隣接した DRG に由来する皮膚性感覚神経を DiI と DiO によりレトログレードに標識することで、遅くとも E9 において、胴体部背側に皮膚性感覚神経の区画が形成されることを示した。さらに、外科的に胴体部 DRG の一部分を除去すると、それに隣接した感覚神経の軸索が、除去された DRG 由来の感覚神経の軸索が占める領域に侵入していた。このことから、感覚神経同士の競合が、背側の皮膚性感覚神経の区画形成に働くと示唆された。区画形成の分子機構の解明にあたり、遺伝子操作した DRG に由来する皮膚性感覚神経の分布を明確に観察するには、頭尾軸にそった特定レベルの DRG を遺伝子操作することが望ましい。このため私は、ミネラルオイルを用いて、水溶性のプラスミド溶液を神経管の局限した頭尾軸のレベルにとどめることで、特定レベルの DRG のみに遺伝子を導入する新規のエレクトロポレーション法を確立した。今後、この技術により感覚神経の区画形成メカニズムの研究が発展すると期待される。

## 序論

神経堤細胞(Neural crest cell, 以下NCCと略す)は、脊椎動物の体幹部における全ての末梢神経系を構成する細胞を含め、数多くの組織／細胞種を生み出す。NCCは発生初期において、外胚葉の将来中枢神経系となる神経板と非神経板から誘導される。その後、神経管の背側上端から上皮間充織転換をへて遊出し、NCC由来の組織が形成される特定の部位に向かって、胚体内を長距離にわたり移動する。発生後期になると、NCCは例えば感覚神経やシュワン細胞、色素細胞など種々の細胞へ分化しさらに軸索伸長、ミエリン鞘形成、色素合成などの形態変化をへて成熟にいたる(図1, Knecht and Bronner-Fraser, 2002; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008; Dupin et al., 2007)。これまで、発生初期におけるNCCの誘導や移動機構は、広範にわたり研究がなされてきた。しかしながら、発生後期において、どのようにNCCは成熟過程を経るのかは未解決な問題が残る。

ニワトリ胚は、胚操作の容易性から頻繁にNCCの研究に用いられてきた有用なモデル動物である。ニワトリ-ウズラキメラ移植によるリネージ解析を始め、組織除去実験によりNCCに由来するDRGの形成に神経管が必須であること、あるいは筋肉への感覚神経の軸索投射に運動神経が関与するなど、NCCは発生過程においてしばしば中枢神経系と相互作用することが示されてきた (Le Douarin, 1999; Landmesser and Honig, 1986; Tosney and Hageman, 1989; Oakley and Karpinski, 2002; Gallarda et al., 2008; Ma and Tessier-Lavigne, 2007; Hippenmeyer et al., 2005; Bhattacharyya et al., 1994; Riethmacher et al., 1997)。こうした組織間相互作用機構は、NCC由来組織で特異的に遺伝子操作することにより解決される。近年、マウスではNCC由来組織特異的に遺伝子操作を行う多数のラインが作られている (Yamauchi et al., 1999; Pietri et al., 2003; Stine et al., 2009; Aldskogius et al., 2009; Danielian et al., 1998; Hsu et al., 2010)。一方、ニワトリでは細胞分化、パターン形成などの分子機構の解析を高効率に行う強力な技術としてin ovoエレクトロポレーション法が確立されている。この方法は、CAGGS (Niwa et al., 1991) など恒常活性型エンハンサープロモーターの下流に遺伝子を挿入したプラスミドを、電氣的にニワトリ胚の細胞へ導入する技術である (Funahashi et al., 1999; Momose et al., 1999; Yasuda et al., 2000)。これまで、NCCにおいて遺伝子操作を行うには、NCCが遊出する前の初期神経管に遺伝子を導入する手法が使われてきた(図2A)。しかしながら、原理上、遺伝子発現は恒常的であり、また細胞分裂とともに導入プラスミド量の減少により一過的であったため(導入後から2日か

ら3日で遺伝子の発現は見られなくなる)、NCC由来組織のみに遺伝子を発現させ続けることは困難であった(図2B, 図3B)。このため、ニワトリにおいてNCC由来組織特異的に遺伝子を発現させる技術の確立が急がれる。

発生段階では、同一の遺伝子が、しばしば異なった状況において繰り返し使われる。この概念はNCCの発生においてもよく当てはまる。NCCの前駆細胞からNCC特異的に発現する転写因子の*Sox10*は、NCCの誘導に必須な因子の維持に働く (Hong and Saint-Jeannet, 2005; Honore et al., 2003; Aoki et al., 2003)。重要なことに、*Sox10*はNCCの多分化能維持や分化にいたるまでの生存因子としても決定的な役割を果たす (Hong and Saint-Jeannet, 2005; Southard-Smith et al., 1998; Kapur, 1999; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001)。従って*Sox10*は、少なくともNCCの誘導から分化までの間に繰り返し使われている。つまり、そのような遺伝子の役割をNCC発生のそれぞれ異なる段階で調べるのが重要である。しかしながら、一般的に、我々は初期発生段階での遺伝子操作から、致死あるいは奇形などの影響により、その後の発生における遺伝子の役割を見逃すことになる。こうした問題は、NCC発生の各段階特異的に遺伝子操作を行うことで解決される。

私は、これらの技術的な問題を解決するため、近年、当研究室で確立された Tol2 トランスポゾン法 (Sato et al., 2007)を利用し、NCC 長期的に遺伝子を発現させた。さらに、体幹部の NCC 特異的な活性を持つ *Sox10* エンハンサーをニワトリゲノムから新規に単離し、これと Tol2 法そして Cre/loxP 法を併用し、NCC 系譜特異的に遺伝子を発現させることに成功した。また、tet-on 法 (Watanabe et al., 2007)を併用することで、E6 から NCC 系譜特異的に遺伝子発現を誘導することが可能となった。更に確立した新規技術を用いて、発生初期の神経軸索に付随するシュワン細胞の動態を記載した。従って、この技術は、発生初期 NCC に影響を与える可能性のある遺伝子の働きを無視して、発生後期 NCC における、遺伝子の特異的な役割を解析する研究に新たな展望を開くだろう。以上の結果は、本論文の「第一部・NCC 由来の組織/細胞種における時空間特異的な遺伝子発現法の確立」としてまとめた。

一方で、NCC由来組織の1つとして、体表にもたらされた刺激を受け取る感覚神経がある。私は、体表における感覚神経のパターン形成の解明を目指し、その解析系を確立したので、「第二部・皮膚性感覚神経の区画形成を解析する遺伝子操作方法の確立」として述べる。

ヒトを始めとする脊椎動物には、圧力や温度などの外的刺激を感受す

る皮膚感覚が備わっており、体表に張り巡った感覚神経(以下、皮膚性感覚神経と記述する)がその機能を支えている。興味深いことに、皮膚感覚は刺激の有無だけでなく、体表のどこに刺激を受けたのかを認識することができる。脊椎動物の成体において、皮膚性感覚神経の細胞体は、脊髄の両脇に形成された後根神経節(Dorsal root ganglia, 以下 DRG と略す)に存在する(図 1)。それぞれの DRG に由来する皮膚性感覚神経網は、体表において固有の領域を支配しており、一部の領域を除いて互いにほとんど重なり合わず、区画を形成する(図 12A, Lee et al., 2008; Scott, 1982; Hari et al., 2004)。実際に医療では、この区画をもとに、障害を受けた DRG を特定する診断手法がある(Lee et al., 2008; Kost and Straus, 1996)。そして、皮膚性感覚神経の区画が乱れたゼブラフィッシュでは、外的刺激に対して本来とは異なる応答を見せる(Sagasti et al., 2005)。このように、皮膚性感覚神経の区画は、皮膚感覚の獲得に重要と考えられている。

皮膚性感覚神経の一連の発生過程を以下に述べる。神経管の背側から遊出した NCC は、頭尾軸に沿って神経管の両脇に分節状に凝集し DRG を形成する(Marmigere and Ernfors, 2007)。それらの DRG から複数の軸索が束になり、皮膚に向かって伸長する(Tosney and Hageman, 1989; Pietri et al., 2003; Inoue and Mihara, 2004)。皮膚に到達した神経束は、枝分かれしながら、感覚神経網を形成する(図 12B, Scott, 1982)。最終的には、それぞれの DRG に由来する感覚神経網は固有の皮膚領域を支配する(図 12A, Takahashi et al., 2003; Wang and Scott, 2002; Scott, 1982)。

これまで、皮膚性感覚神経発生の分子機構の研究では、DRG の形成、感覚神経の束化と伸長、および感覚神経網の形成に焦点が当てられてきた。神経管の脇に凝集した NCC は、DRG を形成する過程で、種々の遺伝子カスケードの働きにより、皮膚性感覚神経が誘導される(Marmigere and Ernfors, 2007)。感覚神経の束化には、分泌性反発因子の Semaphorin が必須と言われている。Semaphorin ノックアウトマウスでは、感覚神経束の脱束化が見られる(Haupt et al., 2010)。その後の、感覚神経網の形成には、Nerve growth factor (NGF) と、そのレセプターの neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (TrkA) による NGF/TrkA シグナルが必須とされている。NGF を受け取る TrkA は感覚神経に発現し、その標的となる皮膚には NGF が発現する。それぞれのノックアウトマウスでは、感覚神経網は、手足の肉球において完全に、あるいは一部を残して見られなくなる(Marmigere and Ernfors, 2007)。このように、DRG 形成から神経網形成にかけての研究は発展してきた。しかしながら、感覚神経の区画化の研究は、特に分子レベルにおいては、未だに全く理解されていない。

伸長途中にある皮膚性感覚神経の競合が、感覚神経の区画形成に働く

といった仮説は、およそ1世紀もまえから、組織学的な観察により、提唱されていた (Cajal, 1919)。実際に、カエル胚の DRG を一部分だけ外科的に除去すると、その DRG に由来する感覚神経の区画に、隣接した DRG 由来の感覚神経は侵入する (Davis and Constantine-Paton, 1983a; Kitson and Roberts, 1983)。また、ニワトリ胚においても、外科的に腰部 DRG の一部分を除去する実験がなされている。カエル胚と同様に、形成不全になった DRG 由来の感覚神経が本来占めるであろう区画に、隣接した DRG 由来の感覚神経は侵入する (Scott, 1984)。このように、皮膚性感覚神経の区画形成には、隣接した DRG に由来する感覚神経同士の競合が、重要であると考えられてきた。

では、どのような分子機構が感覚神経の競合に働くのか？この疑問に対して、感覚神経同士の反発に注目した解析がなされてきた。ニワトリ胚から摘出した DRG をコラーゲンゲルに包埋し、一定間隔を保って2つの DRG を3次元培養する。すると、それぞれの DRG から伸長した感覚神経は、互いに接触する前にU字あるいはL字型に屈曲する。これより競合には、感覚神経から分泌されるなんらかの反発因子が働くと予想されている (Montazeri and Skutella, 2003)。これまで、反発因子や誘引分子など神経ガイダンス分子の働きは、細胞外マトリクスに調節される事例が報告されている (Hopker et al., 1999)。細胞外マトリクスが、感覚神経同士の反発に関与するのかを検証するため、種々の細胞外マトリクスをコートした培養皿に、一定間隔を空けた2つの DRG を2次元培養した実験がなされている。その結果、それぞれの DRG から伸長した神経は、ラミニン依存的に、DRG の付近では接触を伴わず屈曲し、DRG の遠方では接触し伴走する様子が見られた。これより、感覚神経同士の反発は、ラミニン特異的に何らかの誘導を受けると予想されている (Hari et al., 2004)。これらの生体外における研究から、皮膚性感覚神経の競合には、隣接間の感覚神経同士がもたらす分泌性反発因子と、感覚神経周囲の細胞外マトリクスの働きが、重要と考えられている。しかしながら、生体内における、皮膚性感覚神経区画化の分子機構は、依然として明らかではない。

本研究で私は、皮膚性感覚神経区画化の分子機構を解明するため、生体内における実験系の確立を試みた。これにあたり、ニワトリ胚胴体部の背側の皮膚性感覚神経に着目した。皮膚性感覚神経の伸長パターンは、皮膚を2次元に展開することで、高解像度に捉えることができる (Pays et al., 1997)。背側の皮膚は、好都合にも、ニワトリ胚から無傷にはぎ取ることが技術的に容易である(図 13)。本論では、ニワトリ胚の背側においても、皮膚性感覚神経は区画を形成するのか、区画を形成するなら神経の競合作用は関与するのかを検証した。さらに、特定の区画を占める皮膚性感覚神経を遺伝子操作／ラベルする手法を



確立したので、ここに報告する。まず、いつ皮膚性感覚神経が背側の皮膚を覆うのかを把握するため、免疫組織化学的手法を用いて感覚神経の形成過程を観察した。次いで DiI と DiO により、隣接した DRG に由来する皮膚性感覚神経を標識した。これらのことから、E9 において、胴体部背側の皮膚性感覚神経は、区画を形成することが示された。次いで、区画形成の分子機構を探るため、頭尾に並ぶ DRG のうち、特定レベルの DRG を遺伝子操作する技術(Oil エレクトロポレーション法)を確立した。さらに、分子のあるいは外科的に、一部分の胴体部 DRG の形成を妨げることで、背側の皮膚性感覚神経の区画形成においても、感覚神経同士の競合が働くことを示した。今後は、ニワトリ胚の背側の皮膚性感覚神経をモデルとした、その区画形成機構の解明に期待がかかる。

# 材料と方法

## 実験動物

ニワトリ受精卵は、城山鶏園より購入した。受精卵は、内部を加湿し38.5°Cに設定したインキュベーターで孵卵し、各実験に適した段階まで発生を進行させた。本論文中に記す発生段階は、Hamburger and Hamilton (Hamburger, V., and Hamilton, H., 1951)の発生段階表に従った。

## 神経管の除去

受精卵は、約50-55時間孵卵し、st15まで発生させた後、卵殻に穴をあけ、注射器で卵白を1.5ml抜いた。そして、卵殻上方に眼科用ハサミで小窓を開け、胚を可視化するために黒インクをHanks' 溶液 (140mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.6mM glucose, 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM Hepes, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH7)を用いて1:5の割合で希釈し、実体顕微鏡下で、ガラスキャピラリーを用いて胚と卵黄の間に注入した。やや太めに研いだタングステンニードルでビテリン膜を破り、極細に研いだタングステンニードルで20から25体節レベルの神経管を片側だけ切除した。胚操作に用いたタングステンニードルは市販されているφ0.5mmのタングステンニードルを2M NaOH溶液で電気分解により研いだ。その後、卵殻に空けた小窓にセロハンテープをはり、目的の発生段階に至るまで再び孵卵させた。

## DiIとDiOによる皮膚性感覚神経のラベル

目的の発生段階に至ったエンブリオは、PBS (2.73M NaCl, 53.7mM KCl, 166mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 35.3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を注いだシリコンボトムディッシュに移し虫ピンで固定した。実体顕微鏡下で眼科用ハサミとマイクロピンセットで腹側部と臓器を全て取り除いた。そして、腹側の脊椎骨を取り除き、DRGに0.05%DiI/エタノールおよび0.05%DiO/エタノールをガラスキャピラリーで注入し、0.03%アジ化ナトリウム/PBS溶液中にて、常温で45時間放置させた。エンブリオからはぎ取った表皮はスライドグラスに乗せて、カバーグラスを被せて実体顕微鏡(Leica MZ FLIII)で観察した。

## プラスミド

*pT2K-CAGGS-EGFP*, *pCAGGS-T2TP*, *pT2K-BI-TRE-EGFP*: 以上3つのプラスミドは Sato et al., 2007に先述されている。

*pCAGGS-mCherry* , *pT2K-CAGGS-mCherry*: pCAGGS-mCherryを作製するため、mCherry (Clontech) cDNAをpCAGGS (Momose et al., 1999) のXhoIサイトにサブクローニングした。*pT2K-CAGGS-mCherry*を作るため、mCherryをpCAGGS-mCherryプラスミドからEcoRI-EcoRVサイトでカットした後、*pT2K-CAGGS* (Sato et al., 2007)の同一サイトにサブクローニングした。

*pT2K-CAGGS-tdTomato*: pRSET-B tdTomato (Shaner et al., 2004)よりBamHI-EcoRIサイトで切り出し、平滑化した後に、*pT2K-CAGGS*のEcoRVサイトへ挿入した。

*pT2K-enhancer<sup>41</sup>-tk-EGFP*: pEnhancer<sup>41</sup>-tk-EGFPをKpnI-SpeIでカットし、平滑化させて得られたEnhancer<sup>41</sup>-tk-EGFPを、*pT2K-BI-TRE-EGFP* (Sato et al., 2007)をApaI-BglIIIでカットし平滑化させたサイトに挿入した。

*pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre*: ptk-EGFP (Uchikawa et al., 2003)のEGFP-polyAをMCSに交換するため、合成オリゴにて作製したMCS (5'-StyI-ApaI-EcoRV-NdeI-PvuII-StuI-SpeI-3')をStyI-SpeIでカットし、ptk-EGFPの同一サイトに挿入した(ptk-M)。ptk-EGFPよりPCRで増幅したSV40pAをSpeI-SphIでカットし、ptk-Mの同一サイトに挿入した(ptk-MpA)。pXCANCre (Kanegae et al., 1996) からPCRで増幅したNLS-CreをStyI-NdeIでカットし、ptk-MpAの同一サイトに挿入した(ptk-Cre)。さらに、*Sox10* エンハンサー-ptk-EGFPからPCRで増幅した*Sox10* エンハンサーをSalIでカットし、ptk-Creの同一サイトに挿入した。

*pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFP*: 合成オリゴにより作製したMCS(5'-XhoI-ClaI-HpaI-SacI-EcoRI-EcoRV-NheI-KpnI-NotI-SmaI-3')をXhoI-SmaIでカットし、pCALNL5 (Kanegae et al., 1996)の同一サイトに挿入した(pCALM)。合成オリゴから作製したloxPをHpaI-SacIでカットし、pCALMの同一サイトに挿入した(pCALLM)。pCALLMの2つのLoxP間にDsRed2-SV40 polyAを挿入するため以下の手順を踏んだ。DsRed2/pCAGGS (Watanabe et al., 2007)のDsRedとpolyAの間にあるMCSを削除するため、EcoRI-BglIIIでカットしDsRed2とpCAGGSを分離させた。それぞれを平滑末端処理し、再度ライゲーションさせた(DsRed2/pCAGGS-delM)。DsRed2/pCAGGS-delMからPCRで増幅したDsRed2-SV40 polyAをXhoI-HpaIでカットし、pCALLMの同一サイトに挿入した(pCALRLM)。その後、ptk-EGFPからPCRで増幅したEGFPをSmaIでカットし、pCALRLMの同一サイトにEGFPを挿入した

(pCALRLE)。pCALRLEからPCRで増幅したCAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFPをMullでカットし平滑処理を施した後に、pT2K-CAGGSのEcoRVサイトに挿入した。

*pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-rtTA2<sup>S</sup>-M2*: 上記のように作製したpT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFPのEGFPの代わりにrtTA2<sup>S</sup>-M2を挿入させた。

*pCAGGS-Noggin*: 当研究室の齋藤大介助教が作製した。トリ Nogginは、GenBank #NM\_204123 を参照した (ORF 672bp)。ニワトリ3日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD Plus ver2 (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、pCAGGSのXhoI-EcoRV サイトに挿入した。

Forward primer; 5'-cgcCTCGACatggatcattcccagtccttg-3'

Reverse primer; 5'-cgcGATATCctagcaggagcacttgactccg-3'

### 比較ゲノム解析

高度に保存されたゲノム領域を見つけるため、VISTA (Mayor et al., 2000) を用いた。100pb中60%以上が一致した領域を保存領域とした。

### *Sox10*遺伝視座近隣領域の単離と配列解析

*Sox10*近隣のゲノム領域はBAC DNA Clone (CH261-72C6, BACPAC Resources; Tam33-18P11, GENefinder Genomic Resources, Texas A&M University)を鋳型に、KOD Plus ver2を用いて増幅した。増幅したそれぞれ0.6kbから10kbのゲノム断片は、ptk-EGFPベクターのSalI, Sall, Bgl II, XhoI, SmaIサイトに挿入した。ptk-EGFPベクターは、EGFPの5'上流にヘルペスシンプレックスウイルスのチミジンキナーゼの基本転写サイトを含んでおり、大阪大学の近藤寿人教授 (Uchikawa et al., 2004) より供与いただいた。クローニングした全てのゲノム断片は両末端の一部を配列確認した。ゲノム断片のクローニングに用いたプライマーを以下に記述する。#1\_5'-CGCGTCGACAATCTGCCCCCTGTCCTTG-3' (Forward primer), 5'-GACGTCGACTCCAGCCTGAACAACCCAG-3' (Reverse primer); #2\_5'-CGCGTCGACTTTAGGGGCAAACCTGGCAGG-3' (Forward primer), 5'-GACGTCGACAATGAAGATGTGAGGCACGGG-3' (Reverse primer); #3\_5'-GGAAGATCTAATCTGCCCCCTGTCCTTG-3' (Forward primer), 5'-GGAAGATCTGGGAATGCTGATCCAGACATG-3' (Reverse primer); #4\_5'-CGCGTCGACATGAGAGCTGGTGAGCACGG-3' (Forward primer),

5'-GACGTCGACAGAAAAATGCAGCCCCTTGC-3' (Reverse primer);  
#5\_5'-CGCGTCGACTGCAGGACGAACCTGGGTATG-3' (Forward primer),  
5'-GACGTCGACGCGCGAAGCAAGAAAAATGC-3' (Reverse primer);  
#6\_5'-CGCGTCGACACCAAAACCTCCCAGTGGAC-3' (Forward primer),  
5'-GACGTCGACCTTGCCATTTTTCCGCC-3' (Reverse primer);  
#7\_5'-CGCGTCGACAAGACTCGGAGGCGGATGAC-3' (Forward primer),  
5'-GACGTCGACGGAGGTGCTGACAGATTGCG-3' (Reverse primer);  
#8\_5'-CCTCGAGGACAAGAAAACGACCCCCG-3' (Forward primer),  
5'-CCTCGAGTGAGCATTTGCAGCAGGCG-3' (Reverse primer);  
#1-5\_5'-CCCGATATCGAGGTTGGGCTTAGCCTGAG-3' (Forward primer),  
5'-CCCGATATCACCCTGGCCAGTGAAGCACTC-3' (Reverse primer);  
#4-2\_5'-CCCGATATCTCATCGTCTGAACCAGAGC-3' (Forward primer),  
5'-CCCGATATCCATCACCTCCCTGTGCAG-3' (Reverse primer);  
#4-5\_5'-CCCGATATCTCATCGTCTGAACCAGAGC-3' (Forward primer),  
5'-CCCGATATCGAGCCCATAAGCACATCTGAG-3' (Reverse primer).以下のゲノム断片は制限酵素を用いてクローニングした。#1-1は#1のMull-EcoRVサイト、#1-2は#1のBamHIサイト、#1-3は#1のBglIIサイト、#1-4は#1のMull-EcoRVサイト、#4-1は#4のBamHI-NaeI、#4-3は#4-1のXhoI-ApaLI、#4-4は#4-1のEcoT14I-PstIサイトをそれぞれカットした。

## DF1トランスフェクション

基本となる手順はSato et al., 2007に記述されている。ATCCから購入したニワトリ由来の株細胞であるDF1細胞 (Himly et al., 1998)は、10% fetal bovin serumを含むDulbecco's Modified Eagle's Mediumで維持した。5 × 10<sup>5</sup> DF1細胞にそれぞれ500 ng のpT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFP, pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-rtTA-M2, pT2K-BI-TRE-EGFP, pCAGGS-T2TPと0.1ngから50ngのpCAGGS-CreをTonegawa et al., 1997に記述された手順をもとにLipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてco-トランスフェクションした。蛍光の観察はApotome system を搭載したAxioPlanII microscope (Carl Zeiss) あるいはLSM 5 PASCAL confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss)を用いた。

## in ovoエレクトロポレーション法、Oil in ovo エレクトロポレーション法とエンブリオへのドキシサイクリンの投与

*in ovo*エレクトロポレーション法は、Funahashi et al., 1999; Momose et al., 1999; Yasuda et al., 2000; Sato et al., 2002の記述を参考に行った。プラスミドの混合

溶液は、st12のニワトリ胚の神経管に注入した。注入した各種のプラスミドの濃度は、全て $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。なお、Oil エレクトロポレーション法では、プラスミドの混合溶液をニワトリ胚の神経管に注入する前に、ミネラルオイル (suitable for mouse embryo cell culture, light oil, Sigma)を神経管へ注入する。その後、陽極のプラチナの陽極とタングステンの陰極でエンブリオを挟み、電気パルス $12\text{V}$ 、 $25\text{ms}$ を $975\text{ms}$ の間をおいて5回、与えた。エレクトロポレーションから3.5日間孵卵したst26 (5日目胚)のエンブリオに、 $500\mu\text{l}$ のドキシサイクリン(Dox)溶液 ( $0.1\text{mg}/\text{ml}$  in HANKS:  $140\text{mM NaCl}$ ,  $5.4\text{mM KCl}$ ,  $5.6\text{mM Glucose}$ ,  $0.34\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $10\text{mM HEPES}$ ,  $1\text{mM MgCl}_2$ ,  $1\text{mM CaCl}_2$  pH 7.0)を、エンブリオと卵黄の間に注入した。Dox溶液による遺伝子誘導の詳細は、Sato et al., 2007; Watanabe et al., 2007に記述されている。

#### DF 1 細胞における Doxに依存した EGFPの誘導

遺伝子が組み込みまれた細胞株は、24穴ディッシュに $5\times 10^6/\text{穴}$ の細胞を蒔いた。その翌日に、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  となるようDoxを培養メディウムに加えた。Doxを加えた細胞は、4x sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer ( $200\text{mM Tris-HCl}$ , (pH 6.8), 8% SDS,  $400\text{mM dithiothreitol}$ , 0.2% bromophenol blue, 40% glycerol)を直接加えて調整した。その溶出物は、SDS-PAGEにさらした後、抗GFPマウスモノクローナル抗体(GFP (B2), sc-9996, Santa cruz, 1/1000希釈)、抗ゴートポリクローナル $\beta$ アクチン抗体 (ab8229, abcam, 1/1000希釈)、HRP接合型抗マウスIgG抗体 (NA931V, Amersham, 1/1000希釈)、HRP接合型抗ゴートIgG (sc-2350, Santa cruz, 1/1000希釈)を用いて免疫ブロットした。EGFPタンパク質と $\beta$ アクチンタンパク質のシグナルは、ECL Avance Western Blotting Detection kit (Amersham)により検出した。濃度解析は、luminous image analyzer LAS-3000mini (Fuji Film)により行った。

#### 免疫染色

##### ■ 切片の作成

凍結切片の作成では、まずエンブリオを4%パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS溶液により、 $4^\circ\text{C}$ で一晩固定した。続いて10%、20%、30%シュクロース /PBSで段階的に脱水し、O. C. T Compound (Tissu-Tek<sup>R</sup>)で包埋し、液体窒素により凍結した。凍結切片は、クライオスタット(Cryo-Star HM560, MICROM)により $12\sim 16\mu\text{m}$ の厚さにスライスした。図16と図17の切片は、グリセロールで封入し、実体顕微鏡(Leica MZ FLIII)で観察した。

## ■ 切片の染色

凍結切片は、2%スキムミルク/PBS溶液により、室温で1時間ブロッキングし、1/500に希釈したHNK1抗体(BioLad)により、4°Cで一晩反応させた。1次抗体は、PBSで3回洗った後、1/500に希釈したAlexa 568 -mouse IgM (Invitrogen)により、室温で1時間反応させた。2次抗体反応は、PBSで3回洗って停止させ、切片は0.05%Dapiと0.04g/ml DABCOをFluoromount (Diagnostic BioSystems)に加えた封入液で封入した。

## ■ ニワトリ胚表皮の染色

5日目から9日目胚よりはぎ取った表皮は、スライドグラスに乗せてカバーグラスをかぶせ、その隙間に4% PFA/PBS溶液を注入し、氷上で15分間固定した。ブロッキングは2%スキムミルク/PBS溶液により、室温で1時間行った。感覚神経とメラノサイトの検出には、固定した表皮を2%スキムミルク/PBSで常温、1時間放置し、ブロッキング溶液で希釈した1次抗体で4°Cにて一晩インキュベートさせた。1次抗体の希釈率は、抗Tuj1抗体 (R&D Systems)が1/300、抗MITF 抗体 (Invitrogen)が1/100である。その後、PBSで3回洗浄し、ブロッキング溶液で1/500に希釈させたAlexa 568 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) にて、常温で1時間反応させた。2次抗体反応は、PBSで3回洗浄することで停止させ、スライドグラス上に平たく載せて、Fluoromount (Diagnostic BioSystems)により封入した。シュワン細胞の検出には、まず固定した表皮をTNB (0.1 M TRIS-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, Blocking Reagent (Roche)) で1時間、常温にて放置させた。TNBで1/300に希釈した抗P0抗体 (1E8, Developmental Studies Hybridoma Bank)で、4°Cにて一晩インキュベートさせた。その後、TNT(0.1 M TRIS-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20)で3回洗浄し、TNBで1/500に希釈したAlexa 568 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) にて、常温で1時間反応させた。2次抗体反応はTNTで3回洗浄することで停止させた。EGFPシグナルと免疫蛍光はApotome systemが搭載されたAxioPlanII microscope (Carl Zeiss)で検出した。

## 蛍光シグナルの観察と検出

表皮の蛍光写真は、Apotome systemを搭載したAxioPlanII microscope (Carl Zeiss)、fluorescent dissecting microscope (Leica)、あるいはマクロコンフォーカルを用いて撮影した。切片の蛍光画像は、Apotome systemを搭載したAxioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss) あるいは LSM 5 PASCAL confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss)で撮影した。DF1細胞の蛍光画像は、LSM 5 PASCAL confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss)で撮影した。

## 切片 *in situ* ハイブリダイゼーション

ニワトリ *Sox10* の cDNA は、以下のプライマーを用いた RT-PCR により取得した。5'-AATTCTCGAGATGGCTGATGACCAAGATCT-3' (前方) and 5'-AATTGATATCCTATGGTCTGGAGAGAGTCG-3' (後方)。ディグオキシジェンでラベルされた *Sox10* プローブは Tonegawa et al., 2003 に記載された手順に従って準備した。切片 *in situ* ハイブリダイゼーションは、Nakaya et al., 2004 に記述された手順に準じて行った。免疫染色の場合と同様の手順で作製した凍結切片は、PBST (0.1% Tween/PBS) で 3 回洗浄したあと、65°C に暖めたハイブリバッファー (ULTRAhyb™, Ambion<sup>R</sup>) で、1 分間プレハイブリダイゼーションを行った。65°C に暖めたハイブリバッファーに *Sox10* プローブを加えた反応溶液を用いて、65°C で一晩ハイブリダイズした。翌日、洗浄液 1 (5×SSC/50% ホルムアミド/1% SDS) により、65°C で 30 分間洗浄し、洗浄液 2 (5×SSC/50% ホルムアミド) により 65°C で 30 分間の洗浄を 2 回行い、洗浄液 2/TBST (等量) により、65°C で 5 分間、常温で 10 分間、流水に浸して 10 分間と段階的に冷ました。TBST で 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液 (2% BBR (Boehringer Blocking Reagent, Roche)/MABT (0.1M マレイン酸 (pH 7.4), 0.15M NaCl, 1% Tween) により室温で、1 時間ブロッキングした。その後、alkaline phosphatase-conjugated 抗 DIG 抗体 (Roche) をブロッキング溶液で 1/1000 に希釈した反応液により、4°C で一晩抗体反応させた。TBST でリンスし、3 回ほど 2mM Levamisole/TBST により室温で 5 分間洗浄し、さらに NTMT (50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1% Tween) により室温で 5 分間洗浄した。アルカリフォスファターゼ活性は、発色気質の 0.45mg/ml NBT (nitroblue-tetrazolium chloride, Roche) と 0.175mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase, Roche) を NTMT に加えた発色液で検出した。発色反応停止後、4% PFA/PBS により室温で 30 分間再固定し、グリセロールで封入した。



# 結果

## 第一部

### NCC 由来の組織/細胞種における

### 時空間特異的な遺伝子発現法の確立

#### Tol2 法により遺伝子は NCC に安定的に発現された

近年、当研究室から、エレクトロポレーション法でニワトリ胚に導入したプラスミドを、ゲノムに組み込むことで安定的に遺伝子を発現させる Tol2 法が報告された (Sato et al., 2007)。Tol2 法を用いてニワトリ胚の NCC に、遺伝子を安定的に発現させるため、pT2K-CAGGS-EGFP、pCAGGS-T2TP、pCAGGS-mCherry それぞれのプラスミドを E2 の神経管に co-エレクトロポレーションした(図 3A)。図 3B, C の上段と下段のパネルは、異なる発生時期に対する、同一胚、体幹部の横断切片を示している。E3 では、EGFP と mCherry のシグナルが DRG に観察された(n=26)。しかしながら、E7 では、EGFP シグナルは DRG にはっきりと認められた一方で、mCherry のシグナルはほとんど認められなかった(n=11)。さらに、統計的に E3 と E7 の DRG における、mCherry 陽性細胞に対する EGFP 陽性細胞の割合を導出すると、E3 では、 $1.1 \pm 0.2$  であるのに対して、E7 では  $5.7 \pm 2$  であった(図 3D)。

NCC 由来の組織が多く分布する E7 の胚体の表皮近辺を観察した。EGFP シグナルは、感覚神経とその軸索に付随するシュワン細胞、そして多数の仮足をのびた色素細胞に見られた(図 3E-G, どの細胞種も n=7)。それぞれの細胞種は、E7 のニワトリ胚からはぎ取り平たくした表皮組織を、抗 Tuj1, 抗 P0, 抗 MITF 抗体を用いた免疫染色により確認した。したがって、Tol2 法により、遺伝子が NCC 長期的に発現されることが示された。

#### 体幹部で NCC 特異的に活性化する *Sox10* エンハンサーの同定

図 3 に記述した手法では、運動神経を含む脊髄にも、EGFP シグナルは見られた (図 3C)。これより、NCC 特異的に遺伝子を発現させる技術が望まれた。体幹部の NCC 特異的に遺伝子を発現させるため、NCC 特異的に遺伝子の発現を誘導するエンハンサーを用いた方法が考えられた。SRY-ボックス転写因子

の一つである *Sox10* は、NCC 特異的に発現する遺伝子として報告されている (Betters et al., 2010; Cheng et al., 2000; Southard-Smith et al., 1998)。連続切片にてその発現を再確認すると、E2.5 では *Sox10* mRNA の発現パターンが、NCC のマーカーである HNK-1 の染色パターンと一致していた(図 4A)。

*Sox10* のエンハンサーを効率よく単離するため、比較ゲノム解析により、非コード保存領域(Conserved non-coding element, CNE と略す)の検索を行った。ニワトリ *Sox10* の翻訳配列を含む約 43kb と、ヒトゲノムを VISTA (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>)で比較した。指標として 100bp 中 60%以上の配列が一致する領域を保存領域とした場合に、CNE は、*Sox10* 遺伝子座の 5' 側に 5 つ(赤色のピーク, 矢印)、3'側に 2 つ(明るい青色のピーク, 矢頭, UTR)見いだされた(図 4B; 表 1)。ニワトリの *Sox10* を含む BAC クローンを用いて、それぞれ 7 つの CNE を含むゲノム断片を単離し (*Sox10* の翻訳開始配列を基準に -24.8kb から 14.4kb の領域) EGFP レポーターベクター(ptk-EGFP ベクター)の thymidine kinase (tk) basal promoter の上流に挿入した。このレポータープラスミドと、プラスミドが導入された細胞を示す pCAGGS-mCherry を E2 の神経管に co-エレクトロポレーションし、E2.5 においてホールマウントのニワトリ胚体幹部の背側と、その横断切片を観察した (図 4C)。その結果、ptk-EGFP ベクターに挿入した際に、EGFP シグナルが、NCC のみに見られたゲノム断片 (青色のボックス) と、NCC と神経管に見られたゲノム断片 (灰色のボックス) が得られた(図 4B; 表 2)。このあと、それぞれの活性パターンをもつゲノム断片のうち、最も短い #1-4 と #4-1(CNS3 を含む)において詳細な解析を行った。連続切片を作製し EGFP シグナルと *Sox10* mRNA の発現パターンを比較すると、EGFP シグナルは、#4-1 では *Sox10* mRNA 発現領域と重複したが、#1-4 は *Sox10* mRNA 発現領域に加え、非発現領域の神経管にも見られた(図 4D, #1-4, #4-1 とも n=10)。さらに、神経管において、mCherry 陽性細胞に重なる、EGFP 陽性細胞の割合を導出すると、#4-1 では  $0.054 \pm 0.037$ 、#1-4 は  $0.76 \pm 0.161$  であった(図 4E)。これより、#4-1 ゲノム断片(3,571bp, *Sox10* の翻訳開始配列の-10,762 から-7,192 に位置する)は、体幹部の NCC 特異的に活性化する *Sox10* のエンハンサー領域であることが示された。以後、このエンハンサーを enhancer<sup>41</sup> と記述する。

### Enhancer<sup>41</sup> は発生が進むに伴って活性が減少する

単離した *Sox10* enhancer<sup>41</sup> を用いて、NCC 特異的かつ長期的に遺伝子を発現させられるのかを検証した。このため、pEnhancer<sup>41</sup>-tk-EGFP を pT2K-CAGGS-EGFP の CAGGS-EGFP カセットと交換した、pT2K-enhancer<sup>41</sup>-tk-EGFP プラスミドを作製した (図 5A)。このプラスミドと

pCAGGS-T2TP を、図 3 および図 4 と同様に E2 の神経管に co-エレクトロポレーションした。異なった発生段階のニワトリ胚の DRG において、EGFP シグナルと内在性の *Sox10* mRNA を比較するため、連続切片を作製した。内在性の *Sox10* mRNA の発現レベルは、E4 から発生段階を経るごとに低下しており(図 5D)、EGFP 陽性細胞の数も減少していた(図 5B, どの発生段階も同一の露光時間で観察した。E3, E4, E5 はどれも n=6; E6 と E7 は n=3)。Co-エレクトロポレーションしたコントロールベクターの pT2K-CAGGS-mCherry は、E7 まで DRG での発現が見られた(図 5C)ことから、EGFP シグナルの減少は、導入遺伝子の消失によらないことが示された。EGFP シグナルの減少は、DRG において、mCherry 陽性細胞に重なる EGFP 陽性細胞の定量解析でも示した。(図 5E, E3,  $0.46 \pm 0.08$ ; E4,  $0.22 \pm 0.05$ ; E5,  $0.16 \pm 0.08$ ; E6,  $0.12 \pm 0.05$ ; E7,  $0.01 \pm 0.01$ )。これらのことは、単離した enhancer<sup>41</sup> は、DRG において、発生に伴い活性が減少することを示しており、正常発生における、*Sox10* の発現量を反映することが示唆された。

## Tol2 法と Cre/loxP 法の併用

図 5 で enhancer<sup>41</sup> のエンハンサー活性が減衰したことから、一度 enhancer<sup>41</sup> が活性化した NCC で、永続的に遺伝子を発現させる手法が望まれた。このため、上記した手法と、マウスの遺伝学でしばしば用いられる Cre/loxP をもちいた遺伝子組み換え法を併用した。Cre/loxP 法は、一過的に活性化したエンハンサー-Cre でも、Cre を介した組み換えにより、恒常活性プロモーターで遺伝子(例えば EGFP)を発現させることで、EGFP を永続的に発現させることが可能である。このため、細胞種特異的なリネージ解析と、その遺伝子操作に利用される(Abremski and Hoess, 1984; Hamilton and Abremski, 1984; Nagy, 2000)。従って、Tol2 法と Cre/loxP 法を併用した技術(以後、Tol2-Cre/loxP 法と記述する)で、Cre が発現された細胞のみに、永続的に遺伝子が発現されると期待した。

Tol2-Cre/loxP 法が、ニワトリの細胞で働くのかを検証するため、ニワトリ細胞株の DF1 細胞(繊維芽細胞)をもちいた。このため、3つのプラスミドを準備した(図 6A)。pCAGGS-T2TP、pXCANCre (pCAGGS-Cre)、そして pT2K-loxP-DsRed2-loxP-EGFP は、CAGGS 下流に loxP で挟まれた DsRed2 と EGFP を含む。Cre の活性がある場合は、Cre により loxP-DsRed2-loxP (ストップカセット)は除去され、CAGGS により恒常発現されていた DsRed2 にかわって、EGFP の発現が開始される(図 6A)。

これら遺伝子の働きが生じた細胞を得るため、3つのプラスミドを DF1 細胞に co-トランスフェクションさせた。期待どおり、EGFP の発現は 3 日から解析を終了した 25 日目まで見られた(図 6B, F)。コントロール実験として、Cre

がない条件(図 6C)と、トランスポゼースがない条件(図 6D)の 2 種類を行った。Cre がいない場合は、DsRed2 の発現が安定的に見られ、EGFP の発現は見られなかった(図 6C)。トランスポゼースがない場合は、組み換えが成立したことを示す EGFP シグナルは見られたものの、その発現は一過的であった(図 6D)。コントロール実験によるデータは、長期的に発現された EGFP は、トランスポゼースと Cre(図 6B)により、ゲノムへの組み込みと Cre を介した組み換えが、同一の細胞で生じたことを示す。

DF1 細胞における、Cre を介した組み換えと、プラスミドのゲノムへの組み込みは、1,000 細胞に対する EGFP 陽性細胞の割合を導出することで、定量解析した。トランスフェクションから 4 日後では、3 つのプラスミドを導入した EGFP 陽性細胞の割合( $305 \pm 14$ )と、トランスポゼースをふくまないコントロール培養の割合( $285 \pm 21$ )において同様であった(図 6F)。しかしながら、7 日後以降では、それらの培養において顕著な差がみられた。3 つのプラスミドを導入した場合は  $175 \pm 33$  であったのに対して、コントロールでは  $102 \pm 3$  であった。15 日目には、コントロールでは EGFP 陽性細胞は見られなくなり、3 つのプラスミドの培養では、 $98 \pm 3$  の EGFP 陽性細胞が見られた。Cre を含まないもう一つのコントロール培養では (図 6C)、ゲノムへの組み込みが成立したことを示す DsRed2 の発現は見られたものの、EGFP の発現は見られなかった(図 6C, F)。これらより、上記した 3 つのプラスミドを用いることで、Tol2 によりゲノムへ組み込まれた外来遺伝子が、Cre を介して組み換えられることが、ニワトリの細胞で初めて示された。

さらに、DsRed2-loxP ストップカセットの組み換えが、pxCANCre の投与量に依存するのかを調べた。トランスフェクションさせる pxCANCre の量を 0.1ng から 50ng まで徐々に増加させた(図 6E)。トランスフェクションから 16 日後、プラスミド導入細胞 300 個に対して、EGFP(組み換えあり)のみ、DsRed2(組み換えなし)のみ、EGFP と DsRed2 が両方陽性であった細胞の割合を、それぞれ導出した。EGFP 陽性細胞の割合は、5ng 付近で急激に増加し、その後なだらかに上昇する傾向が見られ、相反するように DsRed 陽性細胞の割合は減少した(図 6G)。従って、DsRed2-loxP ストップカセットの組み換えは、Cre のタンパク質量に依存することが示された。

## **Tol2 法、Cre/loxP 法、enhancer<sup>41</sup> の併用による、NCC 系譜に特異的な遺伝子操作／ラベル**

Tol2-Cre/loxP 法により、遺伝子は NCC 特異的かつ長期的に発現させられるのかを検討するため、上記した pT2K-loxP-DsRed2-loxP-EGFP と

pCAGGS-T2TP、そして Cre 発現ドライバーに enhancer<sup>41</sup> を用いた pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre 発現プラスミドを、これまでと同様に E2 の神経管に co-エレクトロポレーションした。コントロール実験として、恒常的に Cre が発現される pxCANCre あるいは、Cre が発現されない ptk-Cre を導入した。E7 のニワトリ胚において、横断切片を観察した。図 7A-C の左右のパネルは同一切片における EGFP と DsRed2 のシグナルを示す。pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre 発現プラスミドを用いた場合には、EGFP シグナルは、NCC 由来の DRG のみに見られた(図 7A, n=15)。これに対して、EGFP シグナルは、pCAGGS-Cre では、脊髄と DRG の両方に見られ(図 7B, n=10)、ptk-Cre では、どこにも見られず、DsRed2 シグナルが脊髄と NCC に見られた。(図 7C, n=10)。さらに、pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre 発現プラスミドを用いた場合において、図 3 と同様に、胚体の表皮をはいで平たくした試料を観察すると、EGFP シグナルは、感覚神経(図 7D, n=7)、シュワン細胞(図 7E, n=6)、色素細胞(図 7F, n=7)に特異的に見られた。これらは、Tol2-Cre/loxP 法の Cre 発現ドライバーに enhancer<sup>41</sup> を用いると、遺伝子は NCC 特異的かつ長期的に発現されることを示す。

### Tol2 法、Cre/loxP 法、tet-on 法の併用

近年、当研究室では、ニワトリ胚においてエレクトロポレーション法で導入した遺伝子の発現を、テトラサイクリン依存的に誘導する tet-on 法が開発された (Watanabe et al., 2007)。そこで、NCC 時空間特異的に遺伝子発現を操作するため、tet-on 法を上記した Tol2-Cre/loxP 法と併用した (以後、Tol2-Cre/loxP-tet-on 法と記述する)。

この技術をニワトリ胚に適用する前に、Tol2-Cre/loxP-tet-on 法)が培養細胞の DF1 細胞で、働きうるのかを検証した。このため、4 つのプラスミドを準備した(図 8A)。このうち、2 つは図 6 で示したプラスミドと同じである (pxCANCre, pCAGGS-T2TP)。pT2K-BI-TRE-EGFP は、tet-responsive element (TRE) に制御される双方向転写ユニットと、EGFP が挿入されている (Sato et al., 2007)。EGFP の発現は、Dox 存在下により活性化した rtTA2<sup>S</sup>-M2(reverse tet-controlled transcriptional activator)により誘導される。rtTA2<sup>S</sup>-M2 は、Tol2-loxP-DsRed2 ベクターへ挿入し、pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-rtTA2<sup>S</sup>-M2 を構築した。rtTA2<sup>S</sup>-M2 は、Cre に依存してストップカセット (loxP-DsRed2-loxP)が切除されると発現される。rtTA2<sup>S</sup>-M2 と EGFP を含むカセットは、(pT2K ベクターにより)ゲノムへ組み込まれるように設計されている。

これら遺伝子の働きが生じた細胞を得るため、上記の 4 つのプラスミドを、DF1 細胞に co-トランスフェクションさせ、Dox あるいは PBS を加えた(図

8B, C)。Dox を添加すると、EGFP 陽性の細胞がいくつか見られたのに対し(図 8B)、コントロールの PBS を添加すると、EGFP 陽性の細胞は見られなかった(図 8C)。これに類似した実験として、Cre 非存在下で Dox を加えると、DsRed2 陽性細胞が見られるばかりで、EGFP 陽性細胞は見られなかった(図 8D)。従って、EGFP 陽性細胞では、Cre を介したストップカセットの切除と、Dox に依存した rtTA<sup>S</sup>-M2 の活性化が同時に生じている。

トランスフェクション後から経時的に観察すると、Cre 存在下で Dox を加えた場合には、それから実験を終えた 21 日後まで、EGFP 陽性細胞が見られた(図 8E)。しかしながら、細胞 1,000 に対する EGFP 陽性細胞の割合は、21 日では 2.4%と、図 6 で示した Tol2-Cre/loxP が約 10%であったのに比べて低かった。図 8 では、2 種類のカセットを同一の細胞に組み込ませる必要があるため、1 種類の組み込みに比べて効率が下がったのだろう。

さらに、Dox を加えた後、遺伝子の発現がいつから開始されるのかを調べるため、4つのプラスミドをトランスフェクションさせ、Dox を加えて見られた EGFP 陽性細胞から、3つの独立した細胞株を樹立した。この細胞株をもちいて、Dox 投与後の EGFP シグナルの変化を観察した。Dox を添加すると、EGFP 陽性細胞は、6時間後に見られ始め、引き続いてその数は増加していた(図 8F)。EGFP のタンパク質量は、ウェスタンブロッティングにより定量解析した(図 8G)。これらの解析は、TRE にドライブされた EGFP の発現が、Dox を投与してから、少なくとも 6時間後に現れることを示している。

### Dox の添加による、NCC 系譜に特異的な遺伝子発現誘導

Tol2-Cre/loxP-tet-on 法により、遺伝子は NCC 特異的かつ Dox 依存的に発現させられるのかを検討するため、上記した pT2K-loxP-DsRed2-loxP-rtTA<sup>S</sup>-M2、pT2K-BI-TRE-EGFP、pCAGGS-T2TP とこれに加えて pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre 発現プラスミドを、これまでと同様に E2 の神経管に co-エレクトロポレーションした(図 9A)。図 9B-F は E5 において、Dox あるいはコントロールとして PBS を添加し、経時的にニワトリ胚の横断切片を観察した実験であり、上下段のパネルは、同一胚の横断切片における、EGFP シグナルと DsRed2 シグナルの写真を示している。E5 においてどこにも見られなかった EGFP シグナルは(図 9B, n=16)、Dox を添加した場合に、E6(n=11)と E7(n=14)において DRG のみに見られた(図 9C, D)。一方で、PBS を添加した場合には、EGFP シグナルは E6(n=15)と E7(n=12)とも、どこにも見られなかった(図 9E, F)。さらに、Dox を添加した場合において、図 3、図 7 と同様に、胚体の表皮をはいで平たくした試料を観察すると、EGFP シグナルは形態的特徴から感覚神経、シュワン細胞、

色素細胞に特異的に見られた (図 9G-I, それぞれ n=3)。これらのことは、Tol2-Cre/loxP-tet-on 法の Cre 発現ドライバーに enhancer<sup>41</sup>を用いることで、遺伝子は Dox の添加に依存し、NCC 特異的かつ長期的に発現されることを示す。

### 新規技術により、末梢神経束に付随するシュワン細胞を **ex vivo** で捉えることが可能になった

新規に確立した技術は、in vivo における NCC 発生後期の洞察を得ることが可能なツールであることを立証するため、末梢組織へ投射される神経に付随したシュワン細胞に着目した。特に、in vivo の 3 次元下における 1 細胞での解析を可能とする、新規技術の利点を活用した。このため、図 7 で記述した Sox10-enhancer<sup>41</sup>、Tol2 法、Cre/loxP 法を併用した技術を用いた。上記の実験で、Sox10-enhancer<sup>41</sup>の活性が、loxP-DsRed2-loxP(ストップカセット)を切断することに不十分であったため、NCC 由来の組織/細胞種が EGFP(Cre が働いた)と DsRed2(Cre が働かなかった)によりモザイクにラベルされたことに気づいた(図 7A, 図 9C, D)。従って、シュワン細胞と軸索を確率論的に異なる蛍光色でラベルするため(シュワン細胞を EGFP で、軸索を DsRed2 でラベルする。その逆もしかり。)、この怠惰な enhancer<sup>41</sup>を利用した。エレクトロポレーションしたニワトリ胚をスライスし、シュワン細胞と軸索が含まれるスライスを、共焦点レーザー顕微鏡にさらした。そして、DsRed2 あるいは、EGFP でラベルされた感覚神経軸索と、それとは異なる蛍光色でラベルされたシュワン細胞に、注意を払った。

E3.5 では、大多数のシュワン細胞は、軸索束の近隣に見られた。それらの細胞は、不規則な形態をしており、糸状仮足や葉状仮足を含む活発な細胞突起が観察された。それらの突起は、ランダムな方向に伸ばされていた(図 10A, n=5, 動画 1)。E4.5 において、蛍光ラベルされたシュワン細胞の振る舞いの多くは、E3.5 に見られたものと大部分が類似していた。時折、細胞の突起を軸索に平行して伸長させるものが見られた(図 10B, n=7, 動画 2)。E7 では、それらに比べてはっきりと細胞の様子が異なっており、シュワン細胞は、薄く長い細胞突起を軸束へ密接させていた。これらの細胞は、わずかに突起を動かしてはいたが、静的であった(図 10C, n=6, 動画 3)。

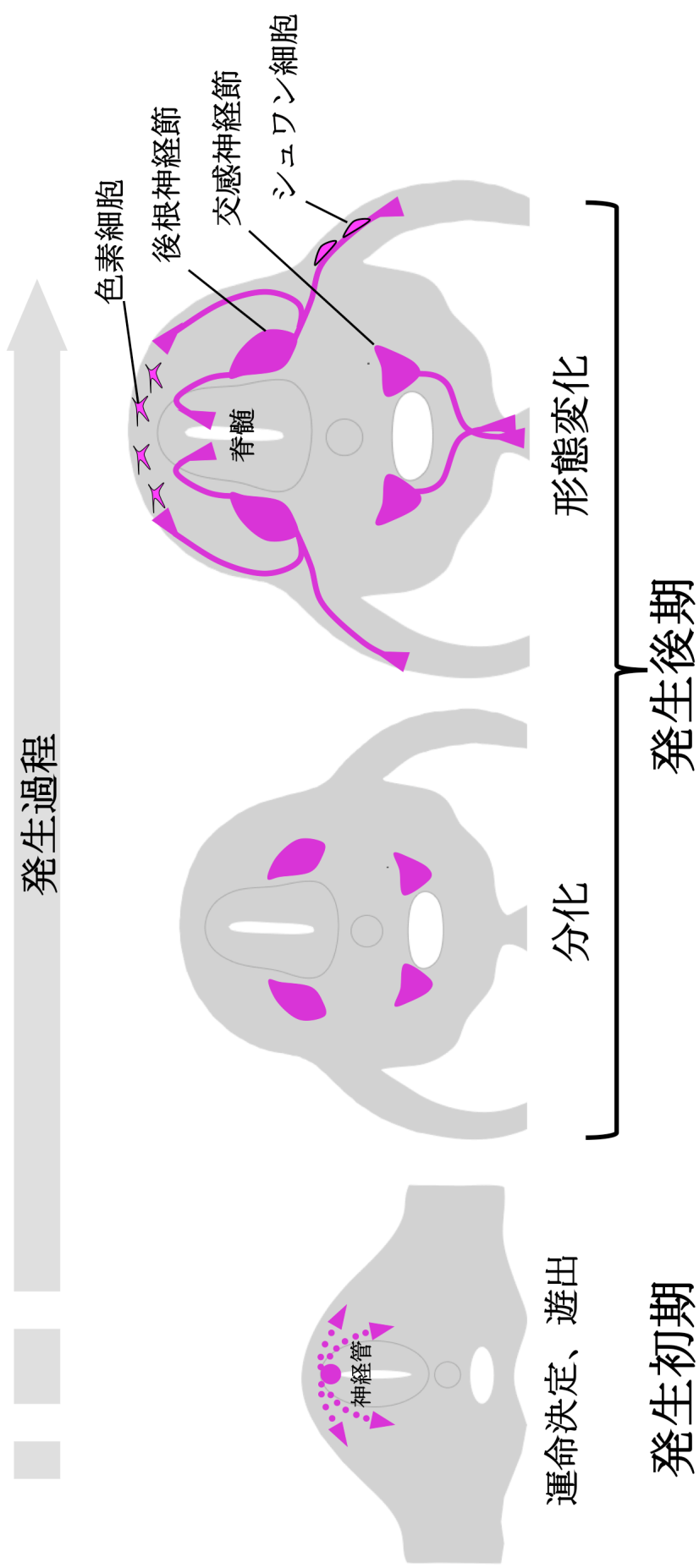
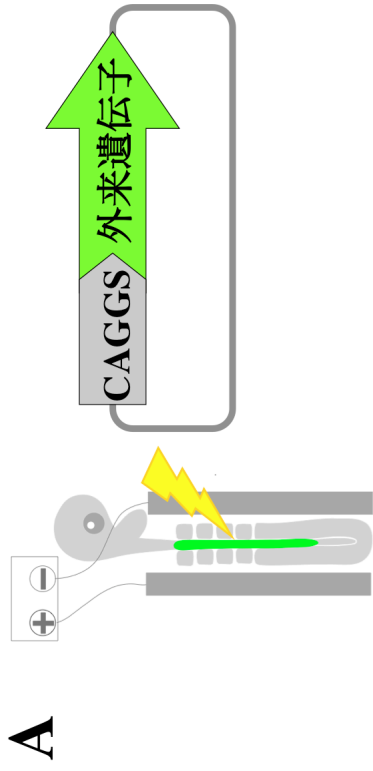


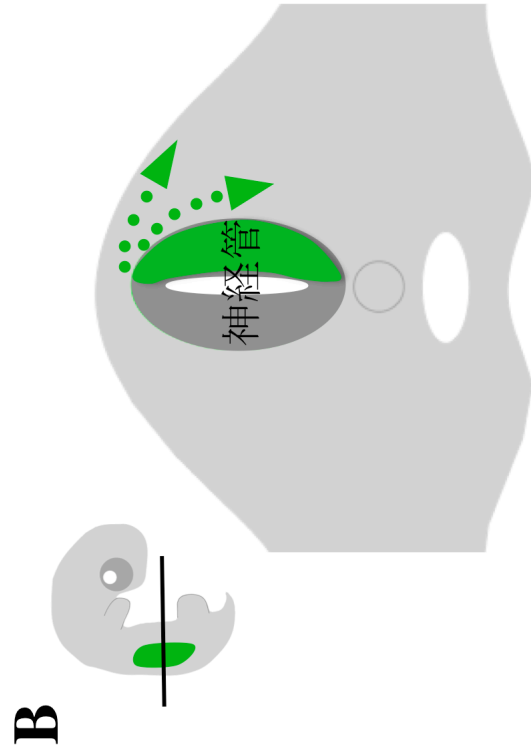
図1. 神経堤細胞(Neural crest cell, NCC)の発生過程

神経管の背側に運命決定されたNCCは、そこから遊出し、所定の部位まで移動する。その後、分化と形態変化をへて、色素細胞、後根神経節、交感神経節、シュワン細胞などを形成する。

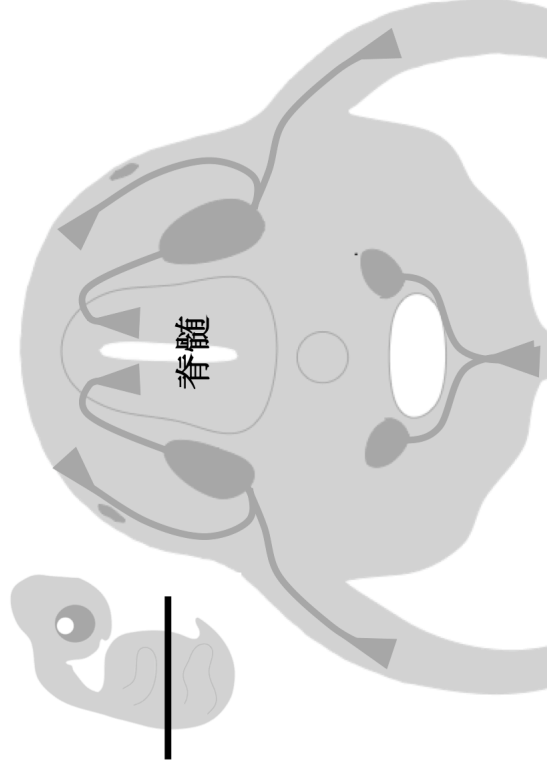




### 発生初期(E2)



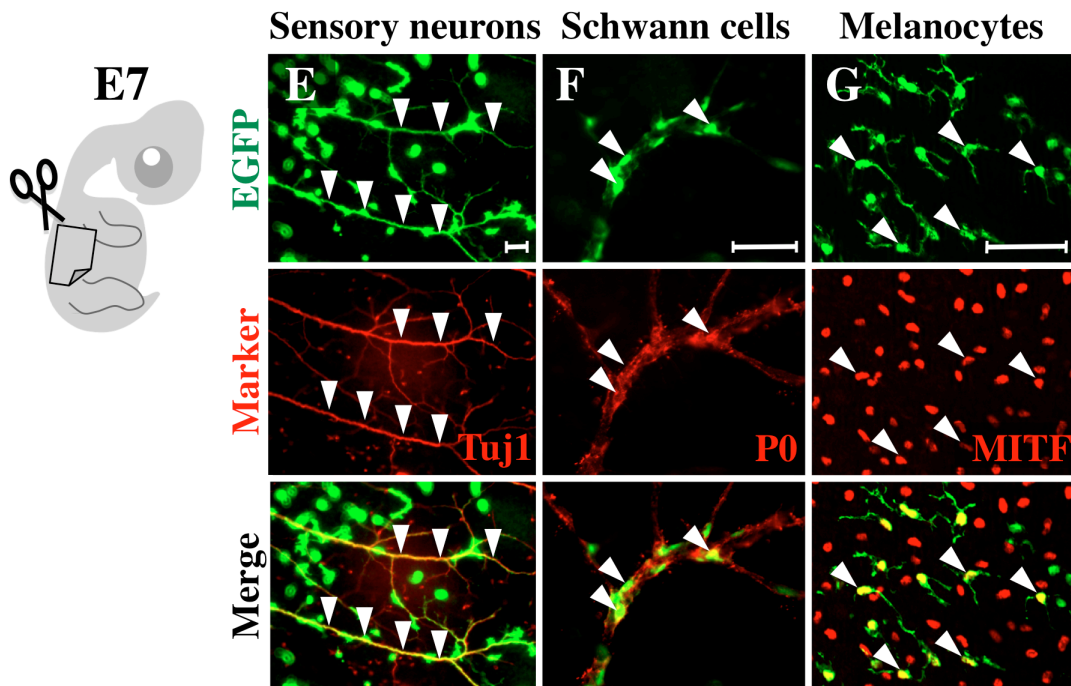
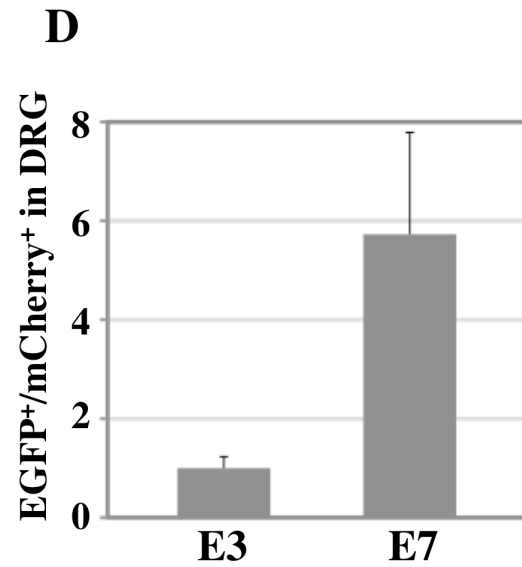
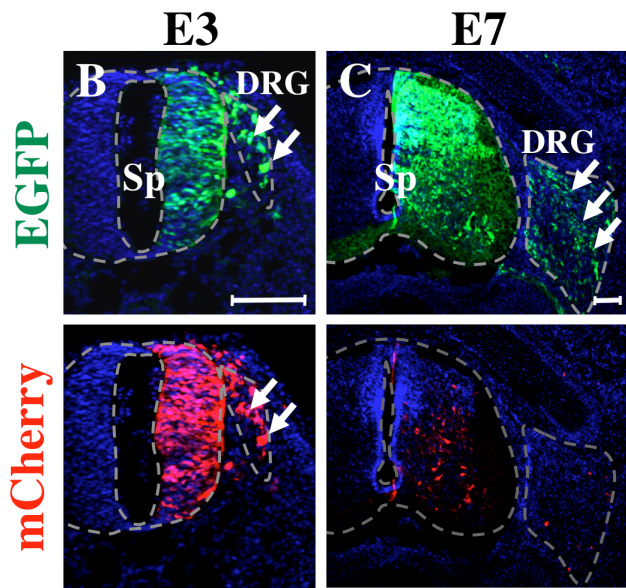
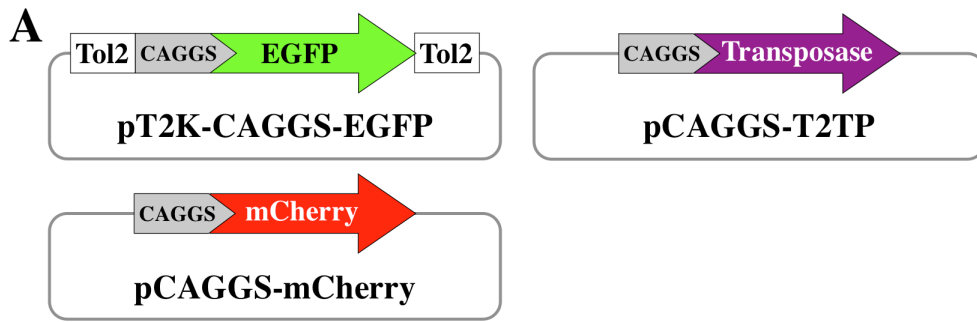
### 発生初期(E2.5, E3)



### 発生後期(E6-)

図2. 従来までのNCCにおける遺伝子操作方法

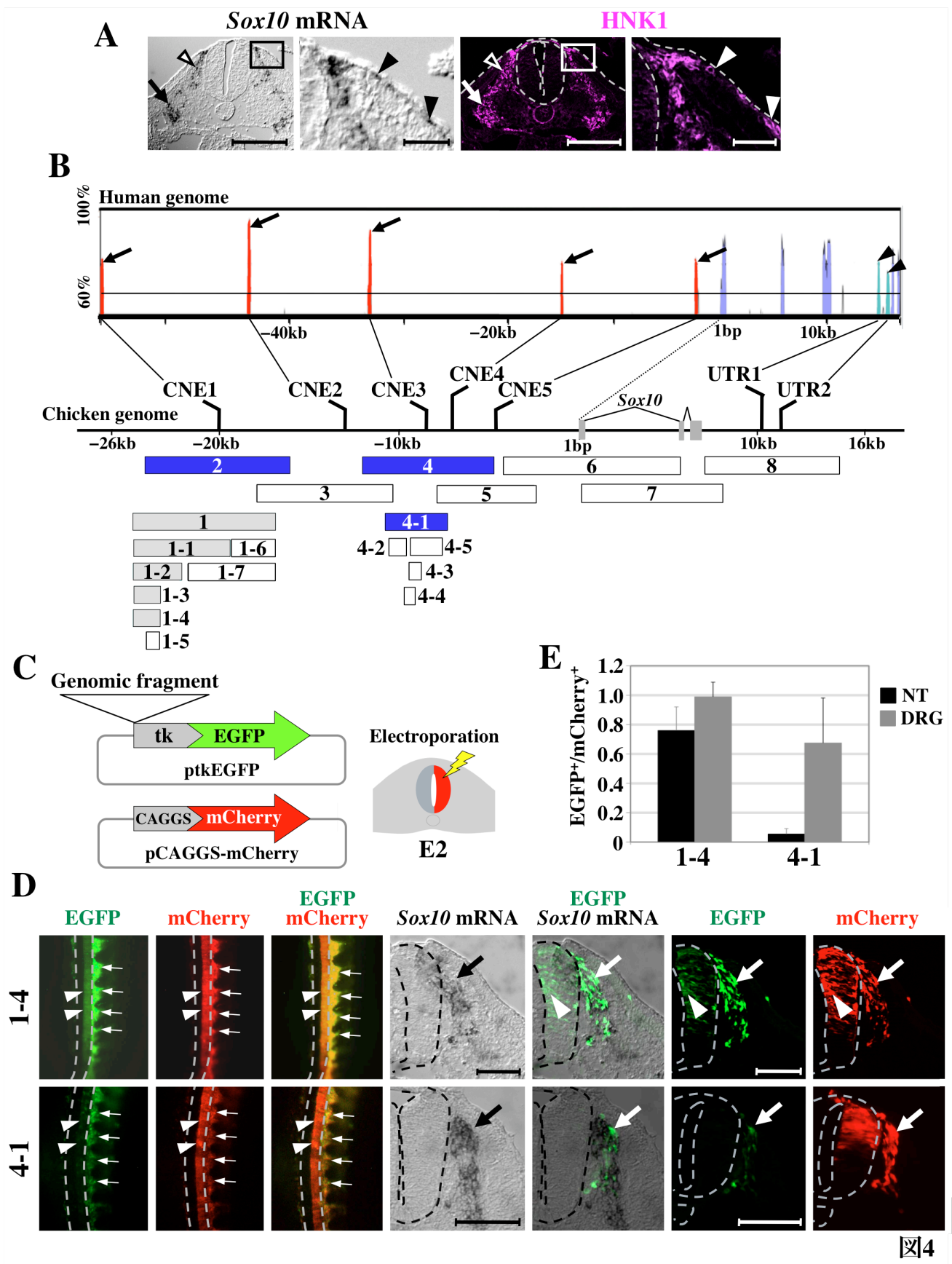
(A)NCCが遊出する以前の発生初期の神経管へ、恒常活性化型プロモーター(CAGGS)の下流に外来遺伝子を繋いだプラスミドをインジェクションし、電気パルスを与える。(B)発生初期(E2.5からE3)のNCCと神経管の両方に遺伝子は発現される。発生後期(E6以降)では、ほとんど遺伝子の発現が見られなくなる。



☒3

### 図3. Tol2法を用いたNCC長期的な遺伝子発現

(A)上に表示した3種類のプラスミドをE2のニワトリ胚の神経管に*in ovo* エレクトロポレーション法で導入した。(B, C)上段と下段ともに各発生ステージにおける同一胚体幹部の横断切片写真を示している。E3では、mCherryのシグナル(ゲノムに組み込まれていない)とEGFP(ゲノムに組み込まれた)のシグナルはNCCに由来するDRG(矢印)と脊髄に見られた(B)。しかしながら、E7では、EGFPシグナルはDRGに見られたのに対し(矢印)、mCherryシグナルはほとんど見られなかった。スケールバー: 100  $\mu$  m。(C) DRGにおいて、mCherry陽性細胞に対するEGFP陽性細胞の割合を統計的に解析した。この統計解析は、異なる胚の体幹部の横断切片(E3, n=11; E7, n=9)をもとに評価した。エラーバーは $\pm$ の標準偏差を示す。(D)エレクトロポレーションしたE7の体幹部から、模式図にしめたように表皮を含む組織をはぎ取って、平たくした標本を準備した。感覚神経は抗Tuj1(E)、シュワン細胞は抗P0(F)、色素細胞は抗MITF(G)抗体により染色した。NT: Neural tube 神経管, Sp: spinal cord 脊髄。スケールバー: 50  $\mu$  m。



#### 図4. *Sox10*エンハンサーを用いたNCC特異的な遺伝子発現

(A) 左右のパネルは、E2.5における連続切片を示す。左は*Sox10 in situ* hybridization、右はNCCマーカーのHNK-1抗体で免疫染色を行った結果である。*Sox10* mRNAはHNK-1のシグナルが見られた、将来DRG(白抜き矢頭)、SG(矢印)、に見られた。スケールバー: 100  $\mu$  m。四角は矢頭で示した、表皮直下を移動する色素細胞の前駆細胞の部分のみを拡大写真である。スケールバー: 20  $\mu$  m。 (B) VISTAを用いて、*Sox10*を含む43kbのニワトリゲノム配列と、ヒトゲノムを比較した。100bp中60bp以上の相同配列が見られた領域を、非コード保存領域(赤のピーク, CNE)、コード保存領域(水色のピーク)として示す。5つの非コード保存領域(CNE1~5、赤色のピーク、矢印)が*Sox10* ORFの5'側に見られ、2つのUTR(明るい青のピーク、矢印)がその3'側に見られた。保存されたコード領域は明るい紫のピークで示した。8つの比較的長いゲノム断片(#1-#8)と、12の短いゲノム断片(#1-1~#1-7, #4-1~#4-5)を、個々にレポータープラスミドのptkEGFPに挿入し(C)、それぞれのエンハンサー活性を検証した。青色のボックスはNCC特異的にEGFPが見られた断片、灰色のボックスは神経管とNCCのどちらにも見られた断片、白色のボックスはエンハンサー活性が見られなかった断片である(表2参照)。 (C) これらゲノム断片をptk-EGFPに挿入したレポータープラスミドは、E2のニワトリ胚の神経管に、pCAGGS-mCherryと一緒にco-エレクトロポレーションした。 (D) #1-4(NCC)と#4-1(NCCと神経管)のゲノム断片におけるエンハンサー活性を示す。左の3枚の写真は、E2.5の同一個体の体幹部を背側から観察した様子を示す。矢頭は神経管を示しており、*enhancer*<sup>1-4</sup>ではEGFP+/mCherry+、*enhancer*<sup>4-1</sup>ではEGFP-/mCherry+であった。小さい矢印は分節的に形成されたDRG(EGFP+/mCherry+)である。ニワトリ胚の横断切片写真を右の4枚に示した。矢頭は、神経管でのEGFPシグナルを、矢印は発生途中のDRGを示す。*Enhancer*<sup>4-1</sup>はDRG特異的に活性化していた。スケールバー: 100  $\mu$  m。 (E) 神経管とDRGにおける、mCherry陽性細胞に対するEGFP陽性細胞の割合を統計的に解析した。この統計解析は異なる胚の体幹部の横断切片(#1-4, #4-1ともn=12)をもとに評価した。エラーバーは $\pm$ の標準偏差を示す。NT: neural tube 神経管。

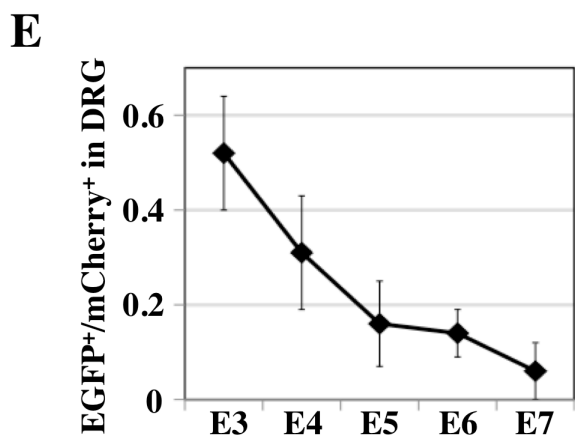
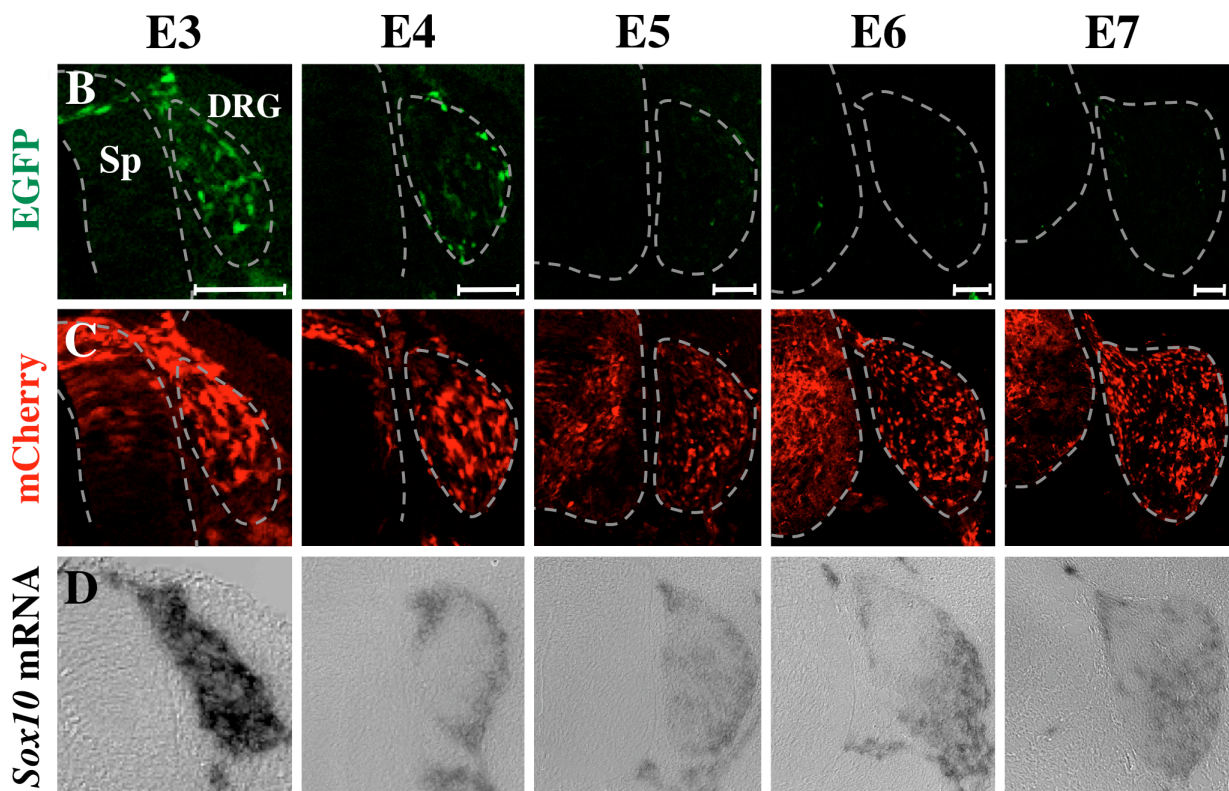
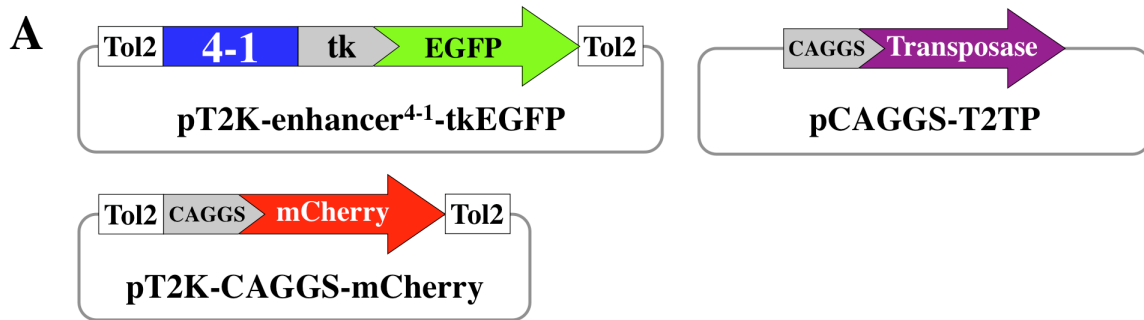


图5

## 図5. ニワトリ胚の発生過程におけるenhancer<sup>41</sup>の活性パターンの変化

(A)に示した3つのプラスミドを発生初期の神経管にco-エレクトロポレーションした。(B, C)どの発生段階も、同一視野におけるEGFPとmCherryの発現を示す。pT2K-CAGGS-mCherryのゲノムへの組み込みが成功しているにも関わらず、EGFPシグナルは、E4より先から減少していた。(D) (B, C)の隣接切片において、*Sox10* mRNAの*in situ* hybridizationを行った。内在性の*Sox10* mRNAもまた、E4より先から減少していた。スケールバー: 75  $\mu$  m。(E) DRGにおけるEGFPシグナルの減衰は統計解析により示した。どの発生段階もn=10である。エラーバーは±の標準偏差を示す。NT: neural tube 神経管, Sp: spinal cord 脊髄。

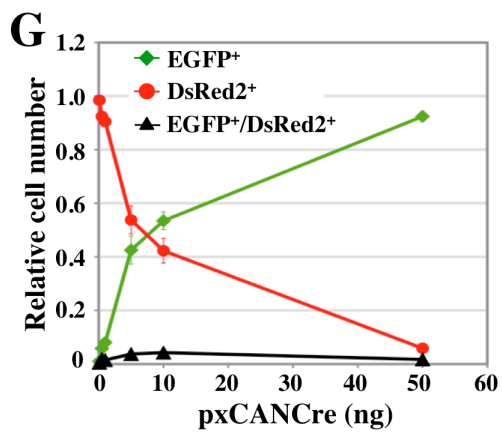
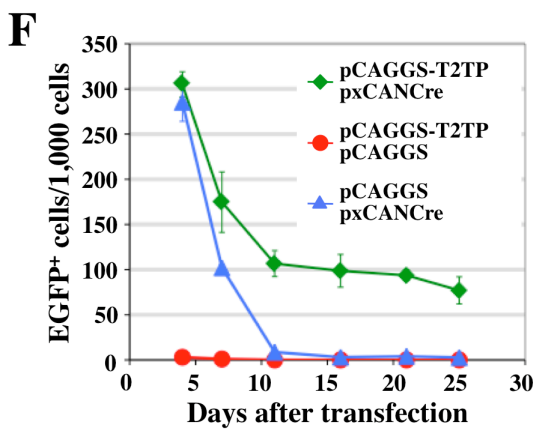
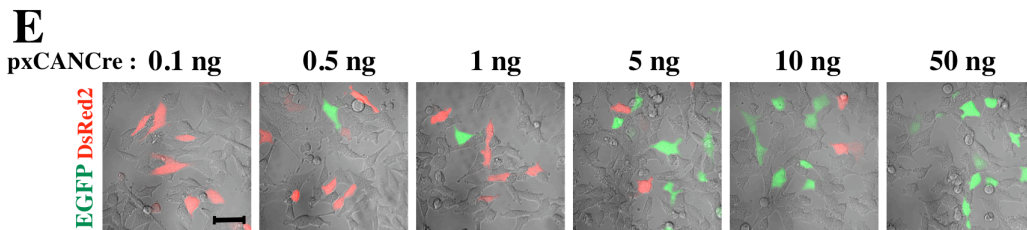
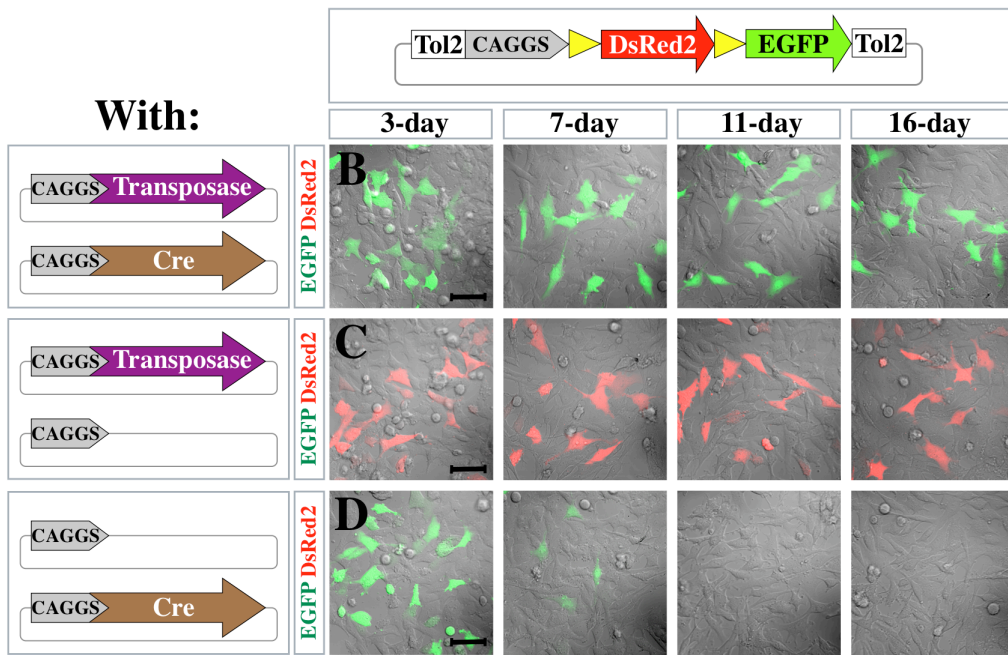
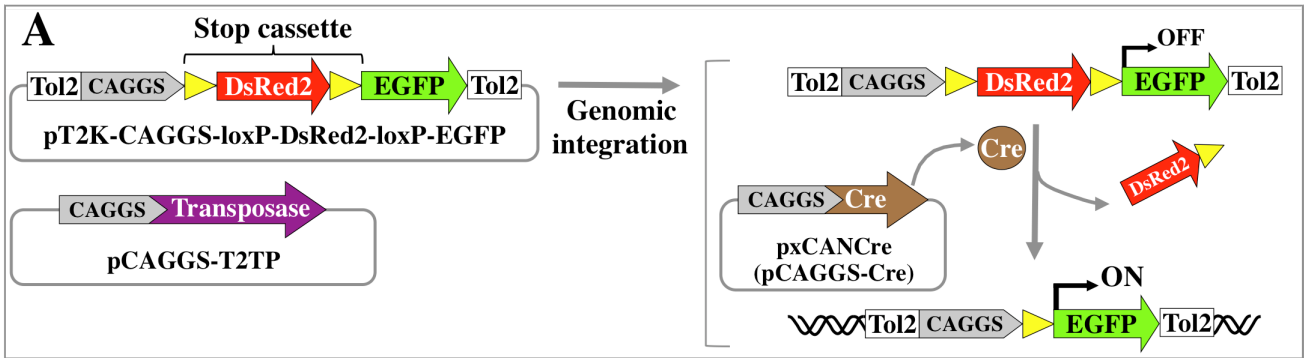


图6



図 6. Tol2 法、Cre/loxP 法を併用した遺伝子発現システムの DF1 細胞を用いた評価

(A)その手法の原理を模式図に示した。loxP-DsRed2-loxP(ストップカセット)は、Cre の活性により除去され、EGFP の発現が恒常的に誘導される。(B-D) DF1 細胞に pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFP、pCAGGS-T2TP、pCAGGS-Cre を co-トランスフェクトさせた。EGFP 陽性と DsRed2 陽性細胞は、異なる時点で評価した。(どれも n=3)。(C, D)はコントロール実験である。スケールバー: 50  $\mu$  m。(E) DF1 細胞に(B)と同様なプラスミドのセットを co-トランスフェクトさせた。pxCANCre (pCAGGS-Cre)の投与量をふって、16 日後に評価した(どれも n=3)。(F) (B-D)の実験における、EGFP 陽性細胞あるいは、DsRed2 陽性細胞の定量解析を示した。(E)における、EGFP 陽性細胞、DsRed2 陽性細胞、EGFP 陽性細胞/DsRed2 陽性細胞の定量解析を示した(G)。

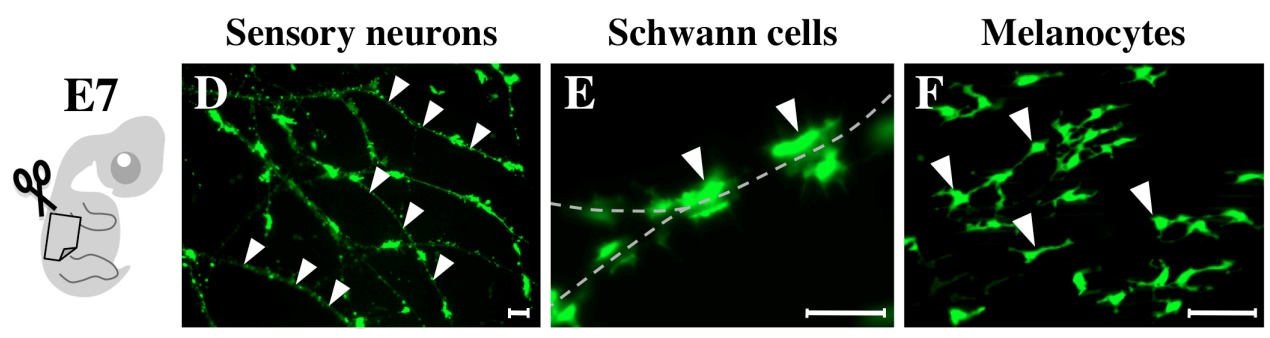
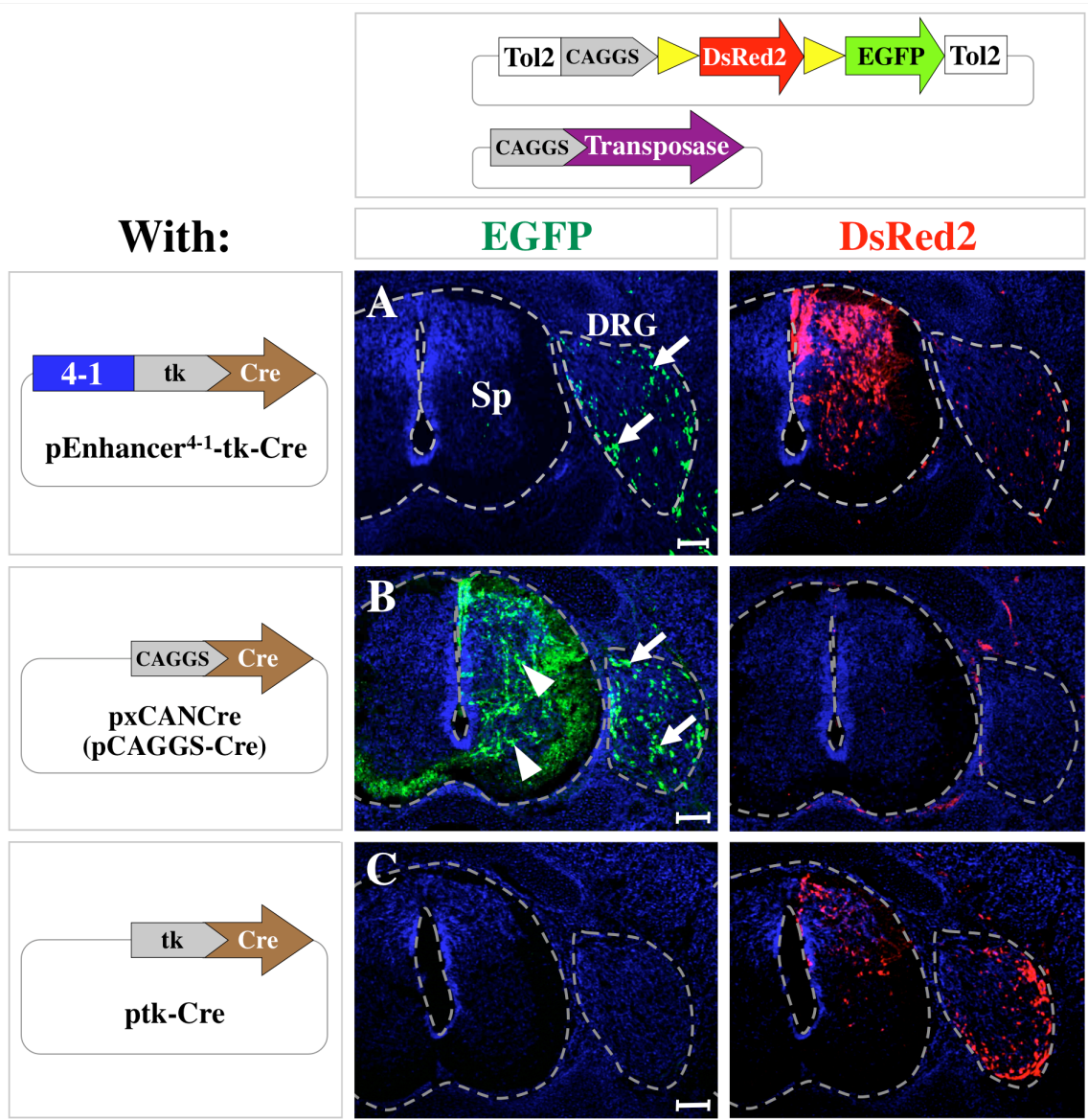
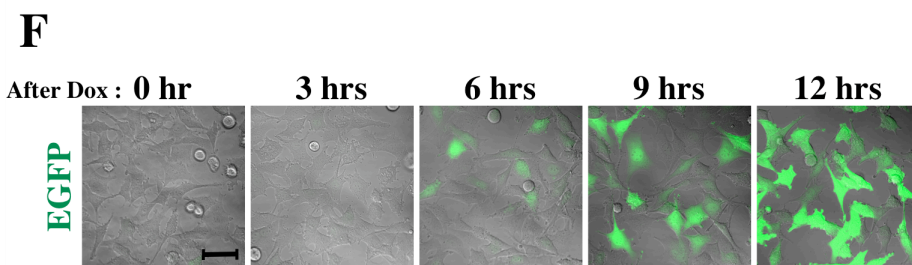
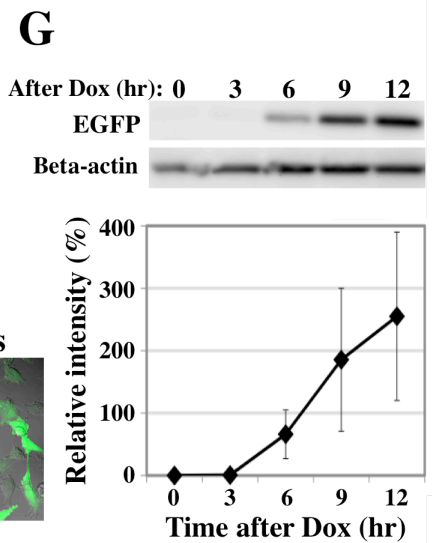
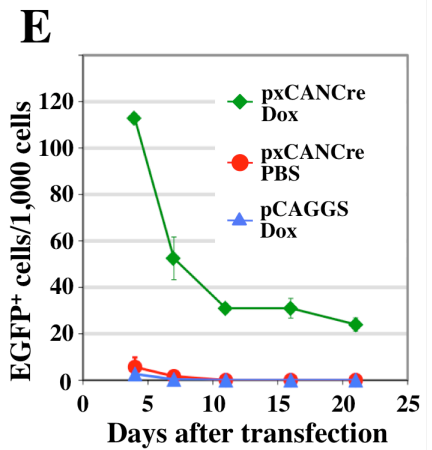
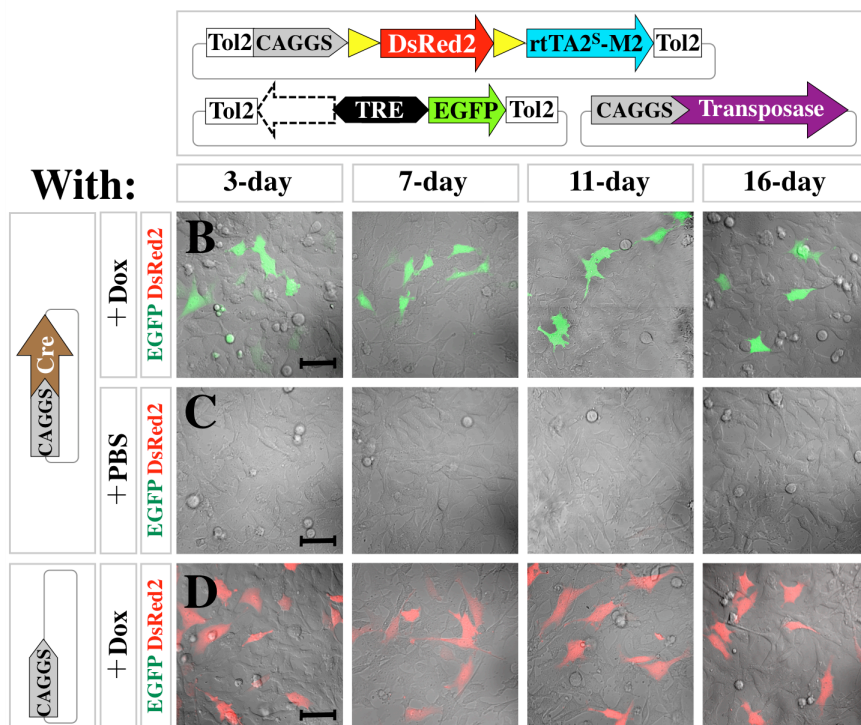
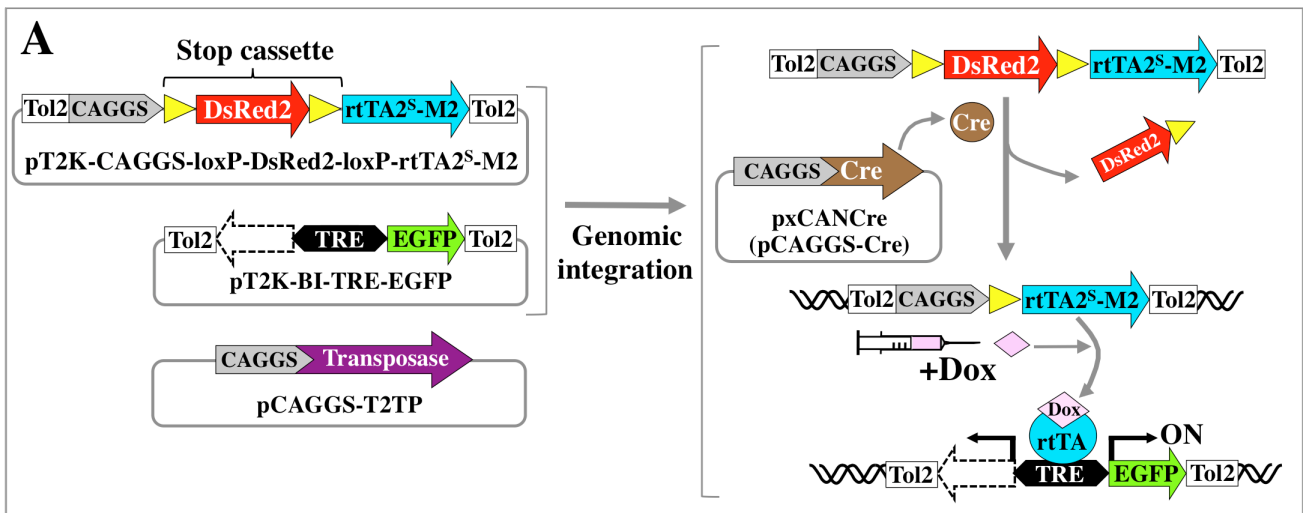


図7. Tol2法、Cre/loxP法、enhancer<sup>41</sup>の併用により、遺伝子はNCC長期的かつ特異的に発現される

(A) pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFP、pCAGGS-T2TP、pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Creを初期ニワトリ胚の神経管にco-エレクトロポレーションした。左右のパネルはE7の同一切片における写真を示す。EGFPシグナルはDRGのみに見られ(矢印)、DsRed2シグナルはDRGと脊髄に見られた。(B, C) (A)のコントロール実験。(B)pCAGGS-Creでは、EGFPシグナルはDRG(矢印)と脊髄(矢頭)の細胞に見られDsRed2は、ほとんど見られなかった。(C) ptk-Creを用いた場合には、EGFPシグナルはほとんど見られず、DsRed2シグナルがDRGと脊髄に見られた。どれもn=15。スケールバー: 100  $\mu$  m。(A)と同様な実験において、E7のニワトリ胚を観察すると、EGFPシグナルはNCC由来の細胞種に見られた(D-F)。感覚神経(D)、シュワン細胞(E)、色素細胞(F)。表皮組織を平たくした試料は、図3E-Gと同様にE7のニワトリ胚から準備した。スケールバー: 50  $\mu$  m。Sp: spinal cord 脊髄。



8

図 8. Tol2 法、Cre/loxP 法、tet-on 法を併用した遺伝子発現システムの DF1 細胞を用いた評価

図 6 で確立した手法に、条件的に発現誘導させるシステムを組み合わせた手法である。(A)ここでは、Cre を介した組み換えにより、EGFP の代わりに rtTA2<sup>S</sup>-M2 が発現される。Dox 存在下において、この転写誘導因子は、pT2K-BI-TRE-EGFP の TRE に結合し、EGFP の発現が誘導される。rtTA2<sup>S</sup>-M2 を含むカセットと、TRE-EGFP を含むカセットが両方とも、Tol2 によりゲノムに組み込まれると、tet-on 法による操作(Dox の添加による)が、発生後期で利用可能となる。(B-D) 3 つのプラスミド(上)と、左に示したプラスミドを DF1 細胞に co-トランスフェクションさせ、EGFP と DsRed2 シグナルを異なった時点で評価した。Cre と Dox 存在下において、EGFP は発現誘導された。スケールバー: 50  $\mu$  m。(E) (B-D)の実験における、EGFP 陽性細胞数の定量解析を示した。(F) EGFP の Dox 誘導発現の時間経過。(B)で示した場合と同じセットのプラスミドをトランスフェクションさせたあと、3 つの細胞株を樹立し、Dox に依存した EGFP の発現を評価した。Dox を加えてから(0h)、EGFP 陽性細胞は異なる時刻に観察した。EGFP シグナルは 6 時間以降で増加した。(F)の EGFP シグナルの増加をウェスタンブロッティングによる定量解析で確認した(G)。

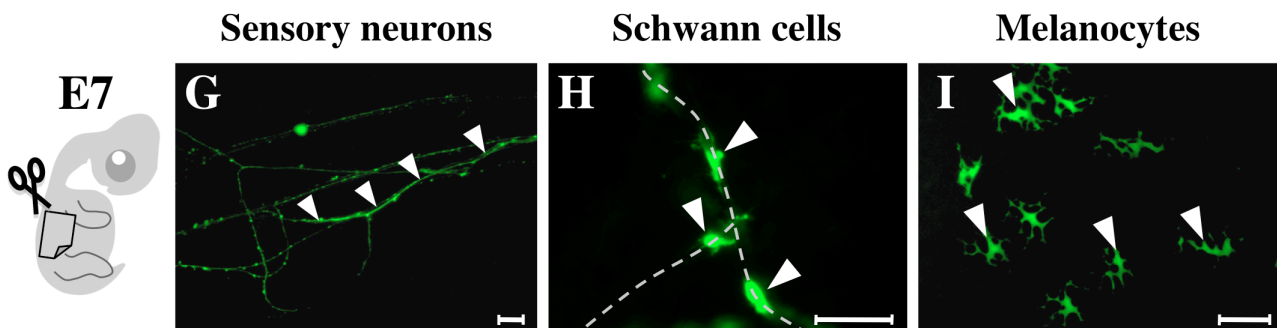
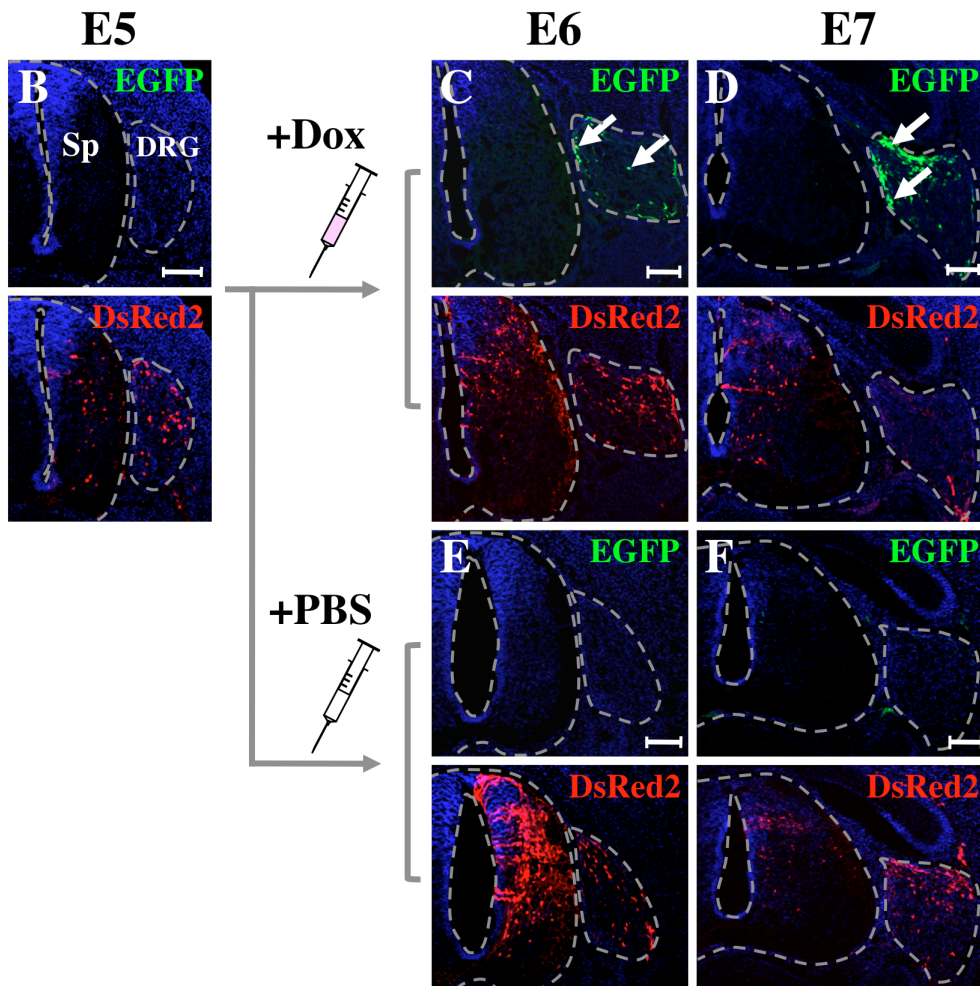
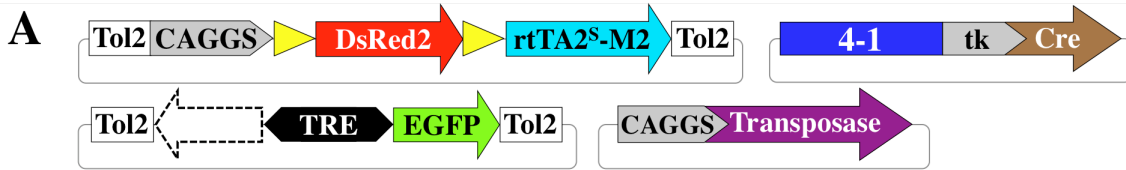


图9

図 9. Tol2 法、Cre/loxP 法、enhancer<sup>41</sup>、tet-on 法の併用により、遺伝子は NCC 時空間特異的に発現される

(A) 実験様式は図8で示したことに類似する。pCAGGS-Cre(図8)の代わりに pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Creを用いた。(B-F) 4つのプラスミドを以前の図で示したように神経管へエレクトロポレーションし、E6とE7において評価した。Doxを添加する以前では、DRGにEGFPの発現が見られず、DsRed2陽性の細胞が脊髄とDRGに見られた(B)。これに対して、Doxを加えた後は、発現誘導に成功したEGFPシグナルが観察された(C, D)。PBSを加えた場合は、EGFPシグナルは観察されなかった(E, F)。スケールバー: 100  $\mu$  m。(G-I) (D)に示したE7において、Doxに誘導されたEGFPは、他のNCC由来細胞にも見られた。感覚神経(G)、シュワン細胞(H)、色素細胞(I)。表皮を平たくした試料は、図3E-G, 図7D-Fに記述した通りE7のニワトリ胚から準備した。それぞれ、n=10。Sp: spinal cord 脊髄。スケールバーは50  $\mu$  m。

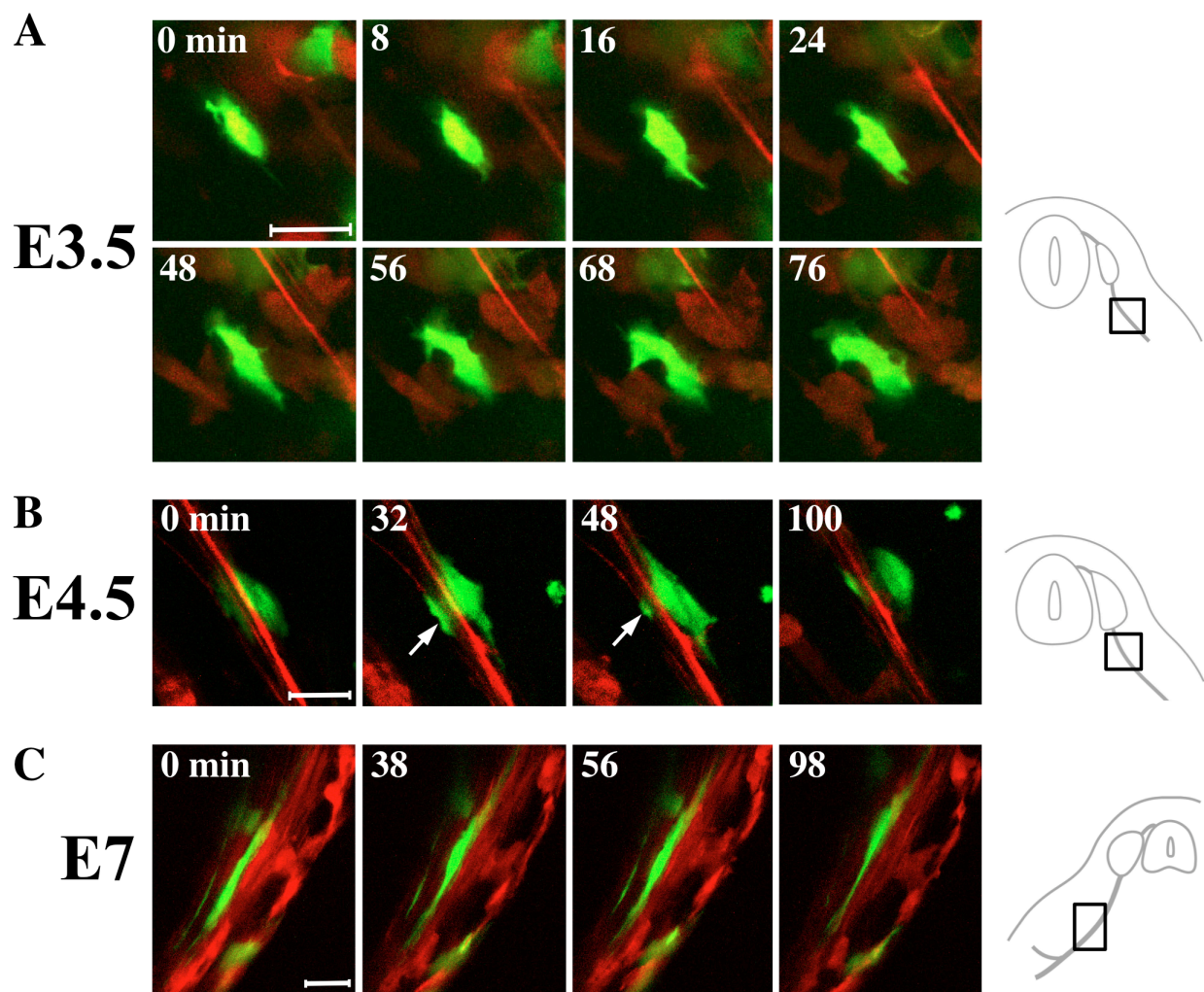


图10



図10. EGFPでラベルされたシュワン細胞とDsRed2でラベルされた感覚神経軸索を同時に捉える、共焦点顕微鏡を用いたライブ観察

3つの異なる発生段階を(A) E3.5、(B) E4.5、(C) E7に示した。全ての資料において、ex vivo培養切片は、pCAGGS-T2TP, pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre, pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFPをco-エレクトロポレーションさせたニワトリ胚から準備した。DsRed2陽性の感覚神経に付随したEGFP陽性のシュワン細胞は、40倍の対物レンズを用いてライブ観察した。それぞれの写真は、動画1-3の一部である。(A) E3.5のシュワン細胞はランダムな方向へ、糸状仮足と葉状仮足様の突起を、活発に伸縮させていた。(B) E4.5では、EGFP陽性のシュワン細胞は、頻繁に葉状仮足様の構造物を軸索に平行して伸ばしており、時折、軸索にたいして垂直方向に突起を伸長させていた(矢印)。(C) E7では、EGFP陽性のシュワン細胞は、DsRed2陽性の感覚神経軸索に密接しており、かなり細長く細胞の突起は静的であった。観察した資料の部位と方向は、図表(左)に示す通りである。スケールバー:20  $\mu$  m

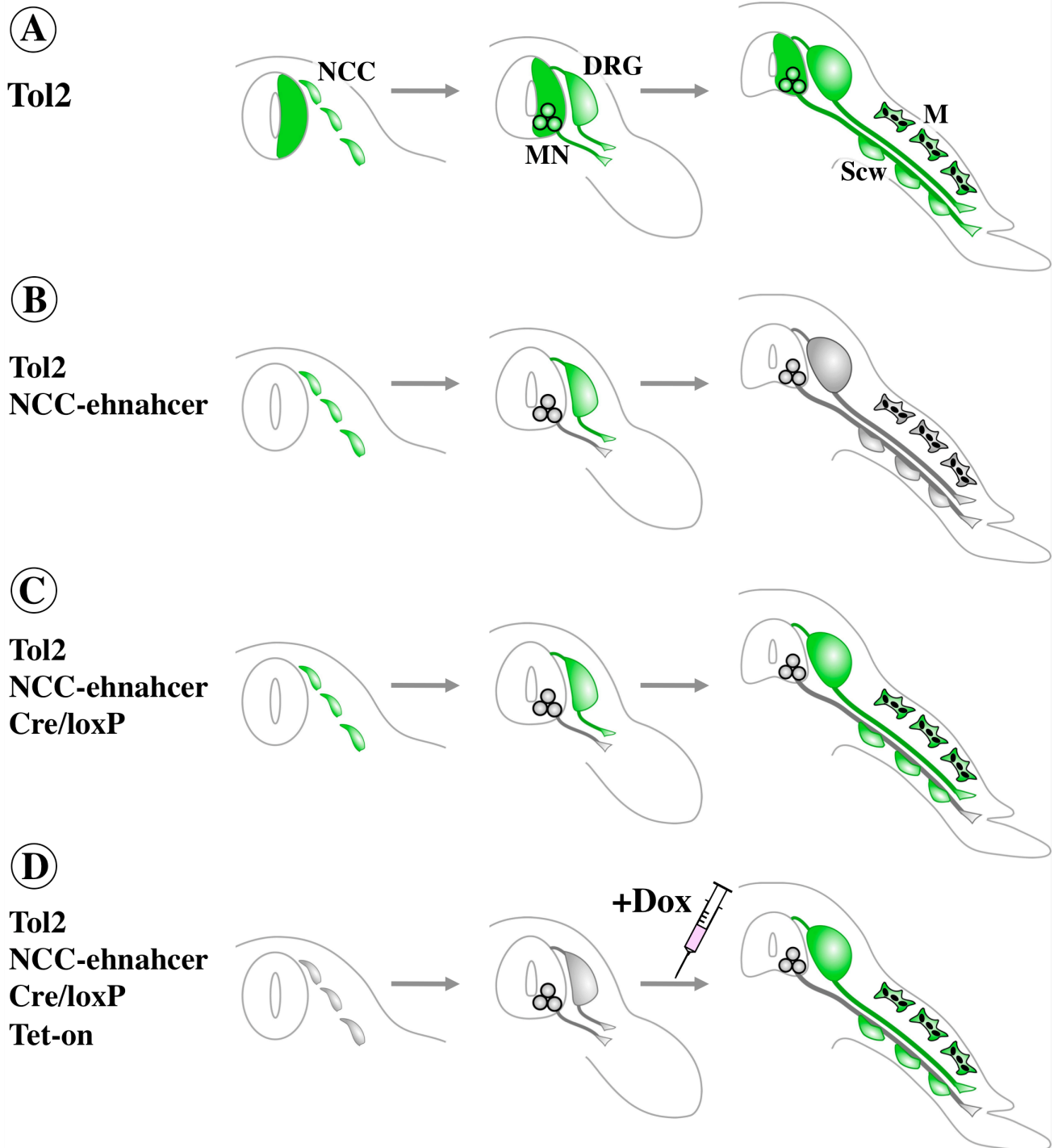


图11

## 図11. 本研究の第一部を要約した模式図

エレクトロポレーションしたニワトリ胚の初期、中期、後期発生段階を表した。初期のNCCから発生後期のNCC由来組織／細胞種を示した。NCC-enhancerを使わないと、NCCに由来しない運動神経もEGFPでラベルされた(A)。(A)から(D)まで、手法を複合させてゆくと、外来遺伝子の発現は、非特異的であるが安定的(A)、NCC特異的であるが持続的ではない(B)、NCC特異的であり持続的である(C)、NCC特異的、持続的であり、時期が調節可能 (D)となる。本論にその詳細を説明した。MN: motor neurons 運動神経, M: melanocytes 色素細胞, Scw: Schwann cells シュワン細胞。

表1. Description of CNEs.

conserved noncoding element	Position in chicken sequence (bp) <sup>a</sup>	Length in chicken sequence	Length in chicken sequence	Similarity in human sequence
CNE1	-20,108 to -19,966	146 bp	146 bp	72.60%
CNE2	-13,012 to -12,887	126 bp	126 bp	94.40%
CNE3	-8,526 to -8,348	179 bp	179 bp	85.50%
CNE4	-7,078 to -6,977	105 bp	105 bp	71.40%
CNE5	-4,658 to -4,527	142 bp	142 bp	69.50%
UTR1	10,124 to 10,243	120 bp	120 bp	74.20%
UTR2	11,149 to 11,361	235 bp	235 bp	68.10%

表1. CNEの詳細

それぞれ、CNE(#1～#5)とUTR(#6～#7)のニワトリゲノム上の位置、長さ(bp)、ヒトとニワトリ配列の類似性を図4に示した。<sup>a</sup>Sox10の翻訳開始配列の位置を+1bpとした。

表2. Details of the genomic fragments used for the enhancer activity assessments.

Genomic fragment	Position in chicken sequence (bp) <sup>a</sup>	Length in chicken sequence	Containing conserved noncoding element	Enhancer activity at st. 18
1	-24,781 to -16,797	7,985 bp	CNE1	NT, NCC
1-1	-24,781 to -19,255	5,527 bp	CNE1	NT, NCC
1-2	-24,781 to -22,036	2,746 bp		NT, NCC
1-3	-24,781 to -23,233	1,549 bp		NT, NCC
1-4	-24,781 to -23,247	1,535 bp		NT, NCC
1-5	-24,149 to -23,364	786 bp		None
1-6	-19,255 to -16,797	2,459 bp		None
1-7	-21,736 to -16,797	4,940 bp	CNE1	None
2	-24,161 to -15,997	8,165 bp	CNE1	NCC
3	-17,947 to -10,223	7,725 bp	CNE2	None
4	-11,994 to -4,645	7,350 bp	CNE3, CNE4	NCC
4-1	-10,762 to -7,192	3,571 bp	CNE3	NCC
4-2	-10,468 to -9,426	1,043 bp		None
4-3	-9,767 to -9,093	675 bp		None
4-4	-9,554 to -8,784	771 bp		None
4-5	-9,237 to -7,445	1,793 bp	CNE3	None
5	-7,829 to -2,204	5,626 bp	CNE4, CNE5	None
6	-4,161 to 5,771	9,932 bp		None
7	157 to 8,073	7,917 bp		None
8	7,097 to 14,637	7,541 bp	UTR1, UTR2	None

表2. エンハンサー活性の評価に用いたゲノム配列(図4に示す)の詳細

それぞれの断片は、ptk-EGFPレポータープラスミドに挿入し、E2のニワトリ胚の初期神経管へとエレクトロポレーションで導入させた。NT: EGFPシグナルが神経管/脊椎に見られた。NCC: EGFPシグナルは初期NCCに見られた。<sup>a</sup>Sox10の翻訳開始配列の位置を+1bpとした。

#### 動画1. E3.5におけるシュワン細胞のタイムラプスイメージ

pCAGGS-T2TP, pEnhancer<sup>41</sup>-tk-Cre, pT2K-CAGGS-loxP-DsRed2-loxP-EGFPをco-エレクトロポレーションさせたニワトリ胚から準備した薄片を、ex vivo培養させた。いくつかのEGFP陽性のシュワン細胞(Creによる組み換えが生じた)はDsRed2陽性の感覚神経軸索(Creによる組み換えが生じていない)の近傍に見られた。そのシュワン細胞は、無作為な方向へ糸状仮足と葉状仮足様の突起の活発な伸縮を示した。40倍の対物レンズで4分ごとに撮影した。動画の総合時間は88分である。

#### 動画2. E4.5におけるシュワン細胞のタイムラプスイメージ

実験手順は動画1と同様である。EGFP陽性のシュワン細胞はDsRed2陽性の感覚神経にやや付随していた。そのシュワン細胞は、軸索と平行した方向へ葉状仮足様の突起をたびたび伸縮させていた。時折、軸索の垂直方向へ突起を伸長させていた。40倍の対物レンズで4分ごとに撮影した。動画の総合時間は280分である。

#### 動画3. E7におけるシュワン細胞のタイムラプスイメージ

実験手順は動画1、動画2と同様である。EGFP陽性のシュワン細胞はDsRed2陽性の感覚神経に密接に付随していた。E3.5とE4.5とは異なり、E7のシュワン細胞は、軸索に沿ってとても細長く伸長しており、それよりも若い発生段階に比べてより静的で、細胞突起の活動はわずかであった。40倍の対物レンズで2分ごとに撮影した。動画の総合時間は160分である。

## 第二部

### 皮膚性感覚神経の区画形成を解析する 遺伝子操作方法の確立

#### ニワトリ胚の背側における皮膚性感覚神経の発生

ニワトリ胚の背側における皮膚性感覚神経軸索の分布を、経時的に観察するため、E5 から E9 のニワトリ胚より胴体部の背側の表皮をはぎ取り、皮膚性感覚神経の軸索を神経軸索マーカーの抗 Tuj1 抗体を用いた免疫染色により可視化した(図 13A)。E5 では、表皮に皮膚性感覚神経の軸索は見られなかった(図 13B, n=4)。E6 では、背側正中線の両側に若干の軸索がみられ、E7 では胴体部の背側全体を覆っていた(図 13C, D, n=4)。さらに発生が進んだ E8 から E9 にかけて、軸索は E7 と同様に背側全体を覆っており、軸束の分枝は E7 に比べより多くなっていた(図 13E, F, n=8)。背側を支配する感覚神経の軸索は、DRG から束となって表皮へ到達する (以後、表皮への軸索束の到達点は、エントリーポイントと呼ぶ。)(図 12B, Pietri et al., 2003)。興味深いことに、E6 から E9 の表皮には、そこに到達した軸索束のエントリーポイントが、背側正中線を挟んで左右のほぼ同一の頭尾軸レベルに対をなしていた(図 13C-F, n=4)。これらのことから、ニワトリ胚の背側において、皮膚性感覚神経は、E5 から E6 にかけて脊髄の両脇に形成された DRG から神経束を伸長させ、左右同一の頭尾軸レベルの皮膚へと到達した後に、少なくとも 2 日間の内に急速に神経網を広げ皮膚全体を覆うことが示唆された。さらに、その後も神経網は維持されつつ、軸索束の分岐が多くなることが示された。

#### 背側の皮膚性感覚神経は区画を形成する

個々の DRG に由来した皮膚性感覚神経軸索の分布と、その隣接間同士の重複を観察するため、E9 のニワトリ胚の胴体部の DRG に、DiI と DiO を注入し、順行的に皮膚性感覚神経をラベルした(図 14A-C n=5)。それぞれ DiI と DiO でラベルされた感覚神経軸索は、背腹に長く頭尾に短い長形状の分布が見られ、頭尾軸に沿って分節状に並んでいた。また、背側正中線を大きく越えて伸長する軸索は見られなかった(図 14D, E)。興味深いことに、それぞれの占める領域には、互いにほとんど侵入せず、わずかに重なっているだけであった(図 14F)。これらのことから、E9 には、各頭尾レベルの DRG に由来する背側の皮膚性感覚神経は、特定のパターンで分布し、互いにほとんど重ならず、区画を形成することが示された。

## **Oil** エレクトロポレーション法は特定レベルの **DRG** に由来した皮膚性感覚神経の遺伝子操作/ラベルを可能にする

区画形成の分子機構を解析するには、遺伝子操作した **DRG** に由来する感覚神経軸索の頭尾軸あるいは背腹軸に沿った分布を、明確に観察することが望まれる。このため、特定レベルの皮膚性感覚神経を遺伝子操作/ラベルする手法の確立を行った。皮膚性感覚神経を遺伝子操作/ラベルする場合、Tol2法で **NCC** に長期的に遺伝子を発現させる手法を本論で先述した(図 3)。先述した手法では、エレクトロポレーションの際に、水溶性のプラスミド DNA (**PT2K-CAGGS-EGFP** プラスミドと **CAGGS-T2TP** プラスミド)を **E2** のニワトリ胚の神経管に注入する。ところが、水溶性のプラスミド DNA は、神経管に注入した直後に拡散するため、電気パルスを与えた際に、頭尾軸に沿った全ての神経管にプラスミドが導入される。このため、特定レベルの **DRG** に由来する皮膚性感覚神経を遺伝子操作することは困難であった。そこで、水溶性のプラスミド DNA の拡散を防ぐため、神経管にミネラルオイルを注入した(以後、**Oil** エレクトロポレーション法と呼ぶ。)(図 15A)。**E9** の縦断切片を観察すると、頭尾軸に沿って脊髄の脇に並ぶ **DRG** のうち、**EGFP** がみられる **DRG** とそうではない **DRG** が明確に区別された(図 15B, n=6)。背側の表皮を見ると、感覚神経軸索束のエントリーポイントから、背側正中線と腹側に向かって伸長する **EGFP** 陽性の軸索が観察された。この際、**EGFP** でラベルされた感覚神経軸索においても、**DiI** と **DiO** で軸索をラベルした場合と同様に、背側正中線を大きく越えて伸長した軸索は見られなかった(図 15C)。これより、**Oil** エレクトロポレーション法は、特定レベルの **DRG** に由来する感覚神経の遺伝子操作およびラベルを可能にすることが示された。

**DiI** および **DiO** を用いた軸索の順行的なラベルと同様に、蛍光タンパク質による軸索のラベリングで、感覚神経軸索パターンを解析した。このため、**Oil** エレクトロポレーション法により 1 から 3 体節分を隔てるように、**PT2K-CAGGS-tdTomato** プラスミドと **pCAGGS-T2TP** プラスミドを **E2** のニワトリ胚の神経管へ導入した(図 15D)。その結果、**E9** において、**tdTomato** 陽性の感覚神経軸索の間に、**tdTomato** 陰性の領域が見られた(図 15E, n=3)。更に発生を進めた **E15** においても、**tdTomato** 陽性の神経軸索の間に、**tdTomato** 陰性の領域が見られ、そこに **tdTomato** 陽性の神経軸索が伸びる様子は見られなかった(図 15F, n=2)。これらは、**DiI** と **DiO** のラベルで示されたように、**E9** には、感覚神経の区画が、形成されることを支持する。さらに、**E9** で形成された区画はその後も維持されることが示唆された。



## 近接した DRG 由来の皮膚感覚神経は、背側の区画形成に必須である

これまで、ニワトリ胚の頸部と足部では、そこを支配する皮膚性感覚神経の区画が、隣接した感覚神経同士の競合作用により形成されると言われている。この知見は、外科的に腰部神経堤の一部分を除去することで、頸部と足において、本来形成されるはずの DRG に由来する感覚神経が占めるであろう領域に、隣接した DRG 由来の感覚神経が侵入したことから示された (Scott, 1984)。これより、胴体部の背側の感覚神経においても、隣接間の皮膚性感覚神経の競合が、その区画化に働くのかを検証するため、胴体部の DRG の形成阻害を試みた。NCC の発生には、分泌性シグナル分子の BMP が必須である (LaBonne and Bronner-Fraser, 1999; Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999)。BMP アンタゴニストの 1 つとして知られる Noggin (Allan M. Goldstein and Nandor Nagy, 2005; Balemans and Van Hul, 2002; Smith and Harland, 1992)を用いて、NCC の発生を阻害し、DRG の形成を妨げた。Noggin 発現プラスミド(pCAGGS-Noggin)を E2 の 3 から 5 体節分の神経管へ Oil エレクトロポレーション法により導入した。これと同時に、pCAGGS-Noggin が導入された頭尾のレベルを示すため pT2K-CAGGS-EGFP と pCAGGS-T2TP を共導入した(図 16A)。E9 のニワトリ胚において縦断切片を作成し、観察すると、EGFP の発現が見られる脊髄近隣の領域では、DRG の形成が見られなかった(図 16B, n=5)。表皮において、抗 Tuj1 抗体を用いた免疫染色により皮膚性感覚軸索の分布を見ると、コントロール側の感覚神経軸索束のエントリーポイントに対応する、Noggin 導入側のエントリーポイントは、見られなかった。それに隣接するエントリーポイントから伸長した神経軸索は、本来形成されるはずの感覚神経が占める領域にまで侵入しており、同一レベルに相当するコントロール側の感覚神経よりも、頭側へ拡張していた(図 16C, n=5)。更に、背側正中線の付近を観察すると、コントロール側の感覚神経軸索は、背側正中線を大きく越えて Noggin 導入側へと伸長していた(図 16D, n=5)。

外科的な手法により神経管を除去し DRG の形成を阻害することでも、Noggin を用いた実験結果と同様な結果が得られるのかを検証した (図 17A)。E2 の神経管の片側をおおよそ 5 体節分に渡り除去すると、それを除去した側の DRG の形成が見られなくなった(図 17B, n=5)。表皮において、抗 Tuj1 抗体を用いた免疫染色により皮膚性感覚軸索の分布を見ると、コントロール側の感覚神経軸索束に相当する、神経管を除去した側の軸索束が見られなかった。それに隣接した感覚神経の軸索は、Noggin を導入した場合と同様に、本来形成されるはずの感覚神経が占める領域にまで侵入しており、同一レベルに相当するコントロール側の感覚神経より頭側へ拡張していた(図 17C, n=5)。更に背側正中線の付近では、コントロール側の感覚神経軸索が、背側正中線を大きく越えて、神

経管除去側へと伸長していた(図 17D, n=5)。従って、ニワトリ胚背側の皮膚性感  
覚神経の区画形成には、隣接間の感覚神経が必須であることが示された。

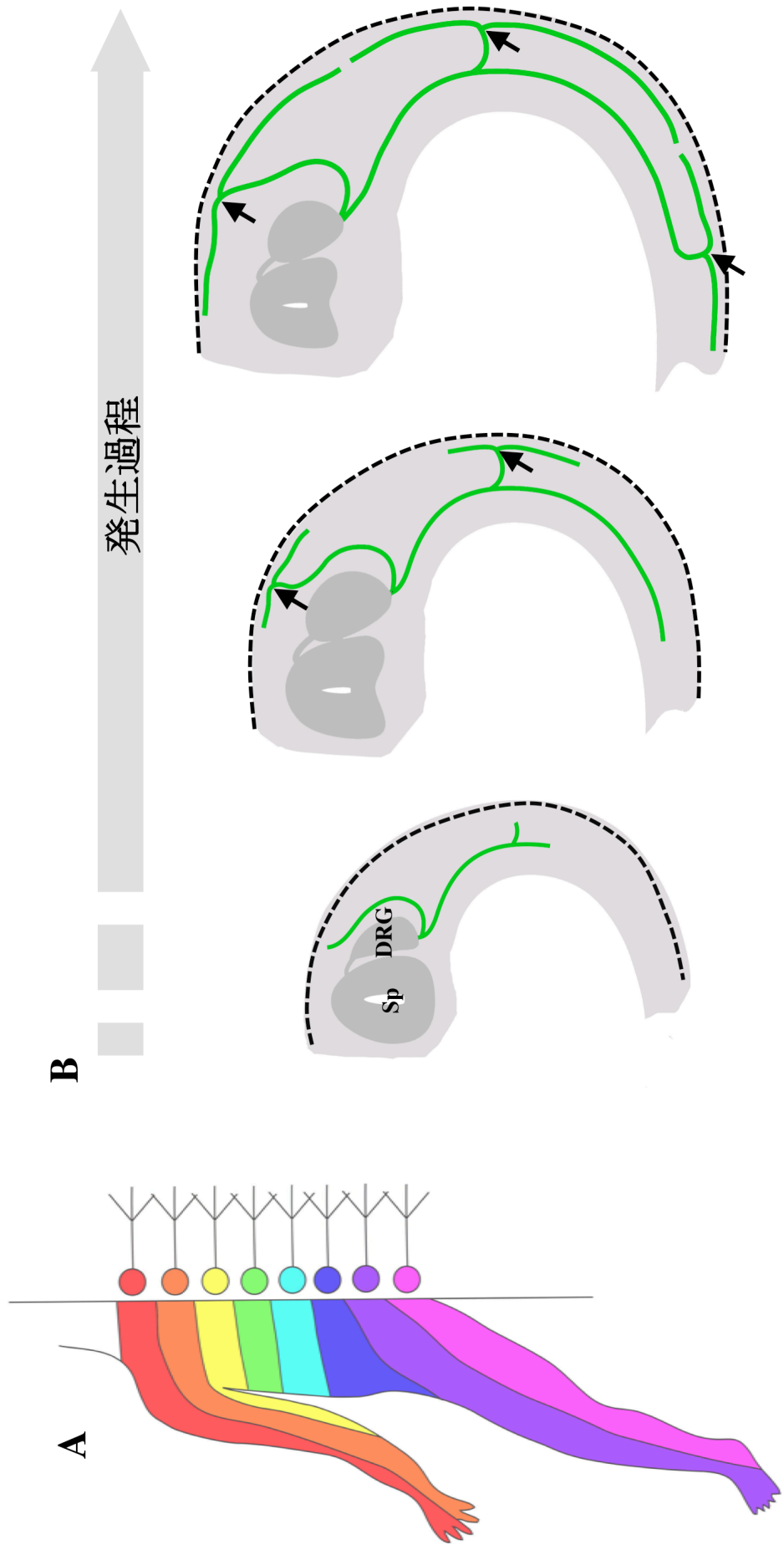


図12. 皮膚性感覚神経の区画とその発生

(A)脊椎動物の成体では、皮膚性感覚神経の区画が形成される。頭尾軸にそって分節状に並ぶDRG (右側に示した丸)に由来した皮膚性感覚神経軸索は、表皮において固有の領域に投射され、その領域は一部をのぞいてほとんど重複しない。(B) 皮膚性感覚神経の発生を模式図で示した。DRGから背腹に受けて感覚神経軸索の束(緑の実線)が伸長し、表皮(破線)に到達する(矢印: エントリリーポイント)と枝分かれしながら、表皮全体に伸展する。 Sp: spinal cord 脊椎, DRG: dorsal root ganglia 後根神経節。

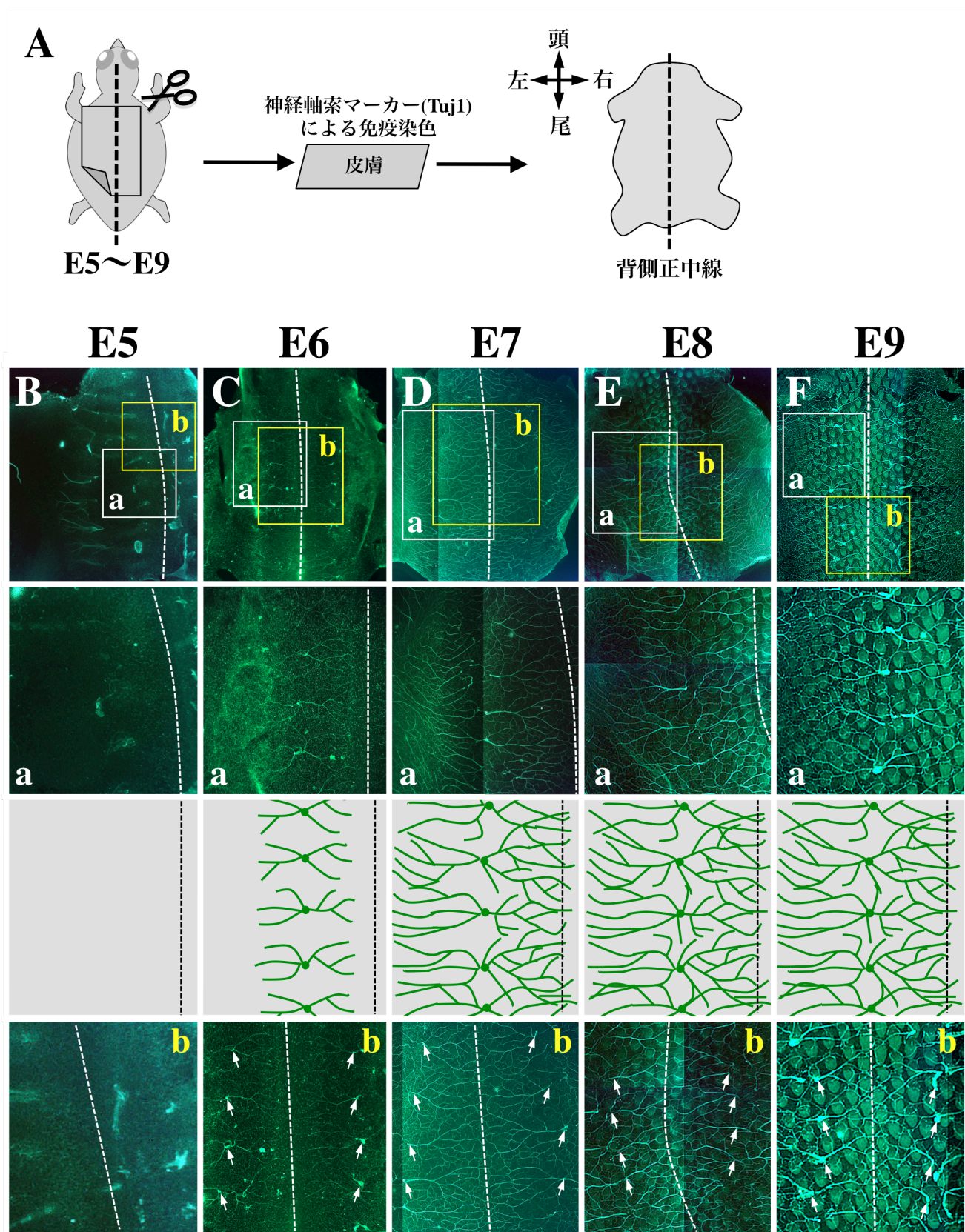


図13

### 図13. ニワトリ胚の背側における皮膚性感覚神経の発生

E5からE9まで、1日毎にニワトリ胚胴体部の背側から皮膚をはぎ取り、抗Tuj1抗体により免疫染色を行った(A)。(B-F)いずれの写真も、(A)の模式図の右端に示す軸に沿って表示した。破線は背側正中線を示す。最上段の写真は、胴体部全体の写真を示す。2段目は、それらの白色の四角(a)で囲った部分の拡大図を示す。3段目は、背側表皮に見られた軸索の分布を示す模式図である。4段目は、最上段の写真のうち黄色の四角(b)で囲った部分の拡大図を示す。矢印は、DRGから背側の表皮へと到達した、感覚神経束のエントリーポイントを示す。(B, a) E5では、背側の表皮に軸索が見られなかった。(C, a) E6では、神経のエントリーポイントから若干の枝分かれした軸索束がみられた。(D, a) E7では、軸索の先端は、背側正中線と脇腹の付近まで到達し、背側全体を覆っていた。(E-F, a) E8とE9にかけて、神経網は背側全体を覆ったまま、E7よりも軸索束の分岐が多くなっていった。(C-F, b) 背側表皮に到達した感覚神経軸束のエントリーポイントが、背側正中線を挟んでほぼ同じ頭尾軸レベルに、対をなして見られた。

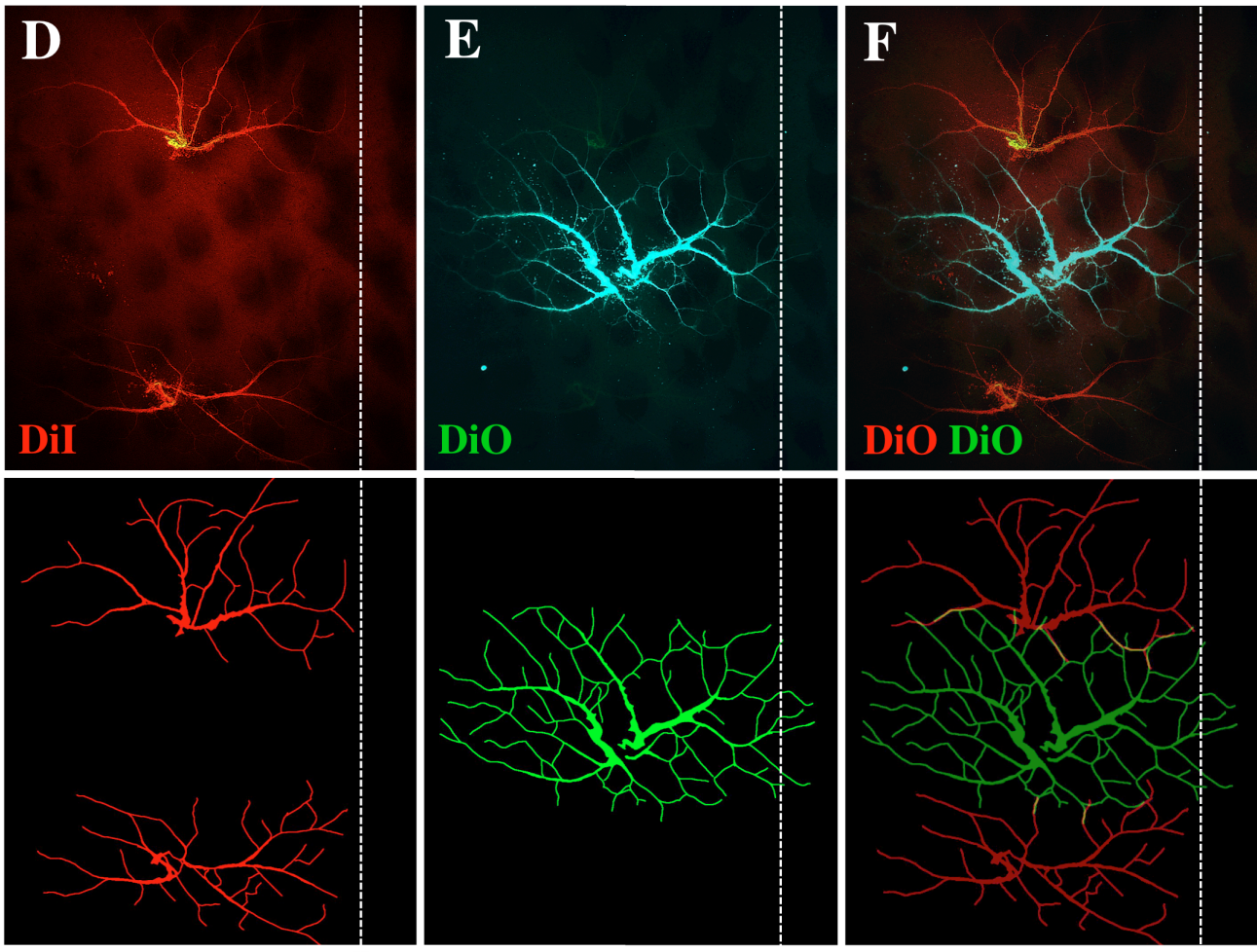
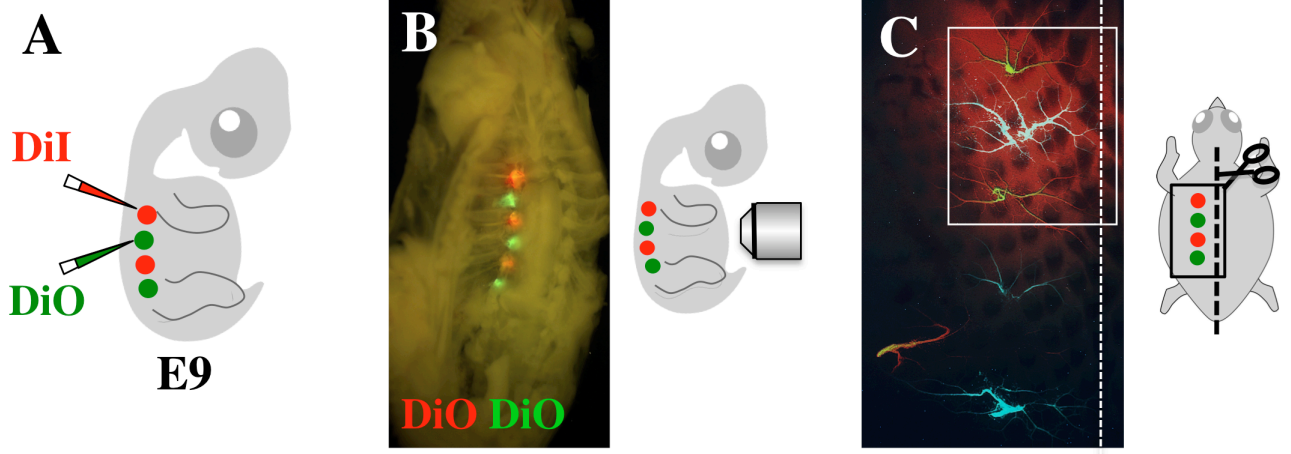


图14

#### 図14. 隣接間のDRGに由来する皮膚性感覚神経の分布

頭尾に並んだDRGを、DiIとDiOを用いて交互に標識した(A)。(B) DiIとDiOで標識したDRGを、腹側から観察した写真を示す。頭尾軸にそって分節状に形成されたDRGが、DiIとDiOにより交互に標識されていた。(C) 背側の表皮をはぎ取り、皮膚性感覚神経軸索の分布を観察した。写真は、紙面に向かって上側が頭側であり、破線は背側正中線を示す。DiIとDiOにより、分節状にラベルされた感覚神経の軸索が見られた。(C)の白枠で囲った部分の拡大写真を(D-F)に示した。(D-F)下段のパネルは、軸索のトレースを示す。DiIとDiOで標識された軸索は、いずれも背腹に長く頭尾に短い特徴的な分布をなしており、分節状の分布が見られた(D, E)。それらを重ねた写真を見ると、DiIとDiOで標識された神経軸索は、互いの領域にほとんど侵入することなく、若干重なっているだけであった(F)。

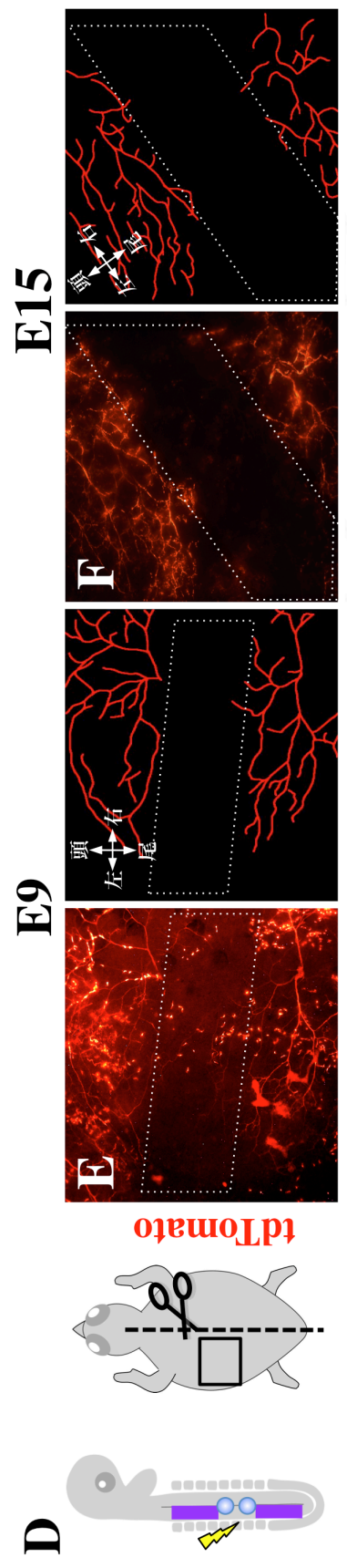
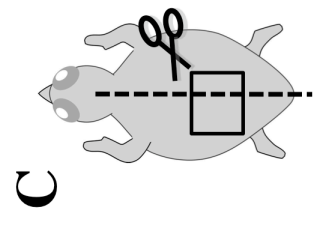
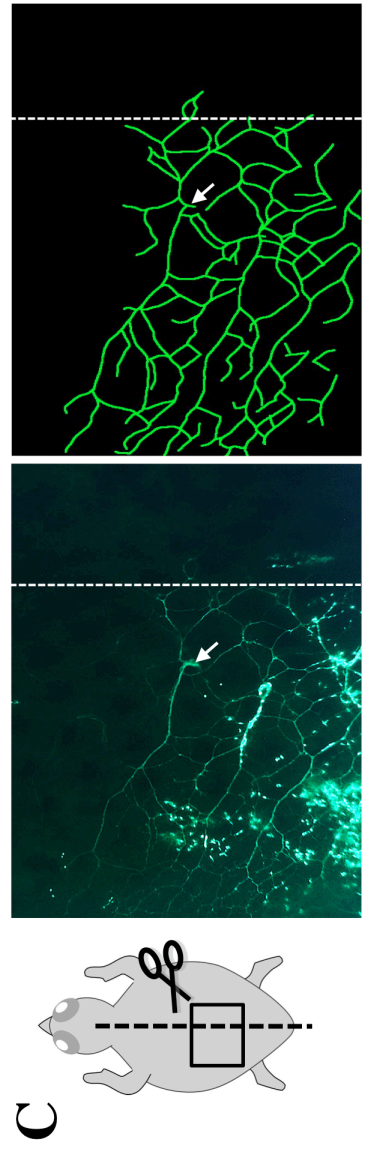
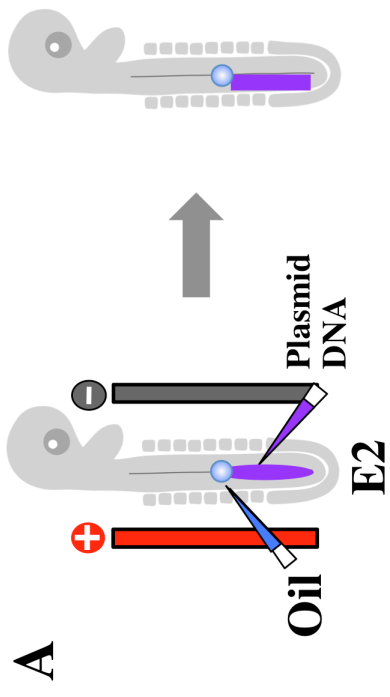
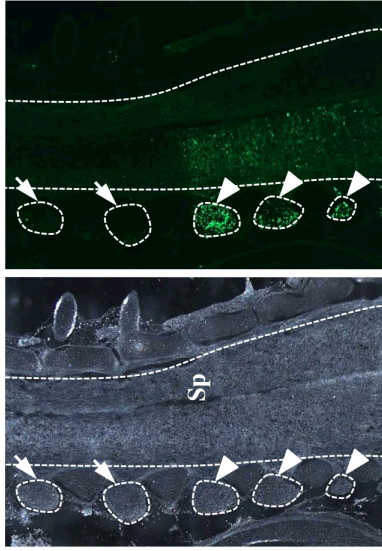
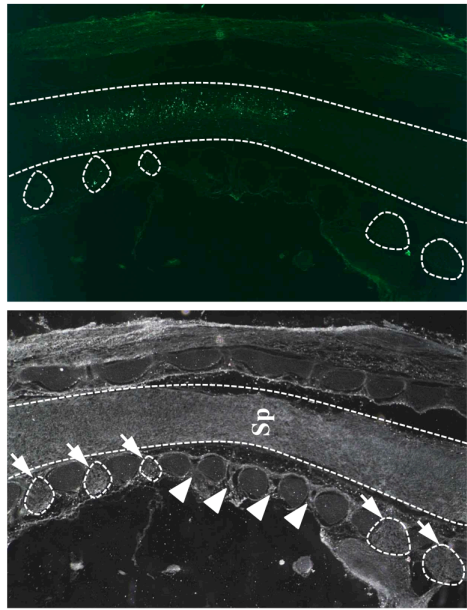


图15



図15. Oil エレクトロポレーション法を用いて、特定レベルの皮膚性感覚神経を遺伝子操作／ラベルした

Oil エレクトロポレーション法の模式図を(A)に示す。E2の神経管の尾側端から、青い丸で示したようにキャピラリで神経管にOilを注入し、次に紫色で示したように、プラスミド溶液(pT2K-CAGGS-EGFP, pCAGGS-T2TP)を注入した。その後、ニワトリ胚の両側に、プラス電極(赤色のバー)とマイナス電極(灰色のバー)を位置させ、電気パルスを与えた。左の模式図には、Oil エレクトロポレーション法により、神経管へ導入されたプラスミドの領域を紫色で示した。プラスミドは、Oilより尾側に、かつ神経管の左側に導入される。(B) E9まで発生させたニワトリ胚を、脊髓に沿って(模式図の実線で示した位置)縦断切片を作成し、EGFPのシグナルを観察した。脊髓の脇に並ぶDRG(矢頭と矢印)のうち、EGFP陽性のDRG(矢頭)と、全くEGFPの見られないDRG(矢印)が、観察された。(C) (B)と同様の実験でE9において、模式図で示した背側正中線の付近を観察すると、EGFP陽性の感覚神経が観察された。右のパネルはEGFPのトレースを示す。最も頭部側のエントリーポイント(矢印)から伸びたEGFP陽性の感覚神経軸索の伸長は、背腹軸に長く、頭尾軸に短かった。また、背側正中線(破線)を大きく越えて対面へ伸長したEGFP陽性の感覚神経軸索は、見られなかった。(D) Oil エレクトロポレーション法により、1から3体節分を隔てたE2の神経管に、pT2K-CAGGS-tdTomatoとpCAGGS-T2TPを共導入させた。(E, F) E9、E15ともtdTomatoが陰性の領域(白の破線で囲った領域)に、tdTomato陽性の軸索は侵入していなかった。写真左のパネルは、tdTomato陽性の軸索のトレースを示す。十字型の両方向の矢印は頭尾左右軸の向きを示す。Sp: spinal cord 脊髓。



**A**

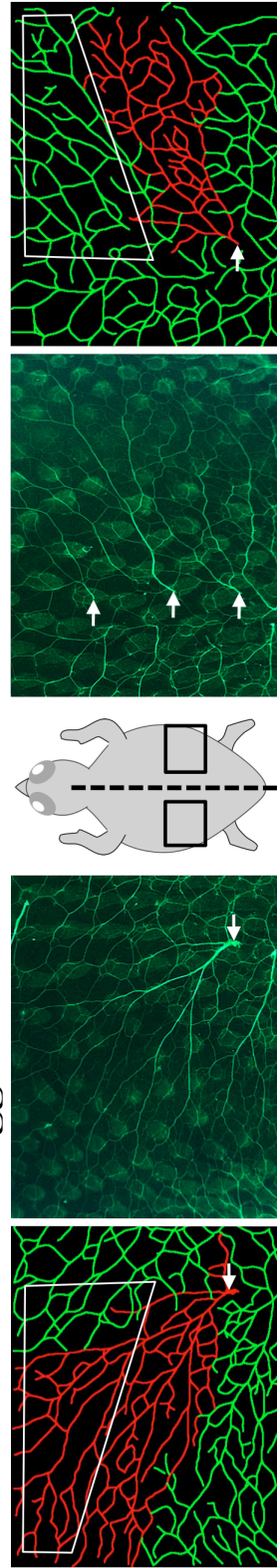
**B**

CAGGS-Noggin | コントロール側  
 E9

**C**

CAGGS-Noggin

コントロール側



**D**

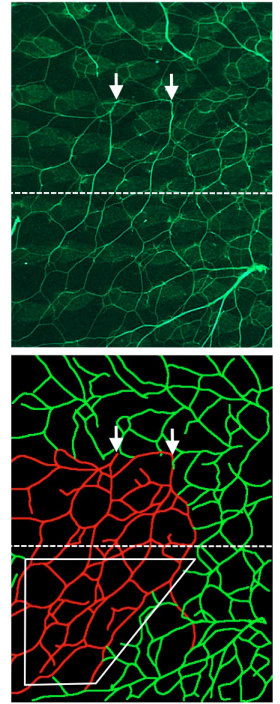


図16

図16. Nogginを用いて特定レベルのDRGに由来する皮膚性感覚神経の形成を阻害した

Oil エレクトロポレーション法により、E2の3から5体節分の神経管へ、pCAGGS-Noggin, pT2K-CAGGS-EGFP, pCAGGS-T2TPを共導入させた(A)。(B) E9まで発生させたニワトリ胚を、脊髄に沿って(模式図の実線で示した位置)縦断切片を作成し、EGFPのシグナルを観察した。EGFP陽性の脊髄の付近では、一部DRGの形成が見られなかった(矢頭)。形成が見られたDRGを矢印で示した。(C, D) 抗Tuj1抗体を用いた免疫染色により、皮膚性感覚神経の軸索を可視化した。模式図には、観察したニワトリ胚の部位を示した。写真の左右のパネルは感覚神経のトレースである。矢印のエントリーポイントに由来する軸索を赤で示した。(C)のNoggin強制発現側とコントロール側は、どちらも背側正中線をまたいだ、同一の頭尾軸レベルの視野を示す。両方の視野とも、同一面積の写真である。コントロール側の視野では、3つのエントリーポイントが見られたのに対して、Noggin強制発現側では、1つのエントリーポイントしか見られなかった。Noggin強制発現側に見られるエントリーポイントから伸長した感覚神経軸索は、本来隣接した感覚神経が占有するであろう頭側の領域(トレースの白枠で囲った部分)にまで侵入していた。一方、それに対応するコントロール側の感覚神経は、頭側に隣接した感覚神経の領域(トレースの白枠で囲った部分)には侵入していなかった。(D) コントロール側の感覚神経が、エントリーポイント(矢印)から背側正中線(破線)を大きく越えて、左側の本来対面の感覚神経が占める領域(トレースの白枠で囲った部分)に侵入していた。Sp: spinal cord 脊髄。



図17. 神経管の除去により特定レベルのDRGに由来する皮膚性感覚神経の形成を阻害した

E2の神経管の左側を、およそ5体節分にわたり、外科的に除去した (A)。(B)その後、E9まで発生させたニワトリ胚の縦断切片あるいは横断切片を示す。どちらも、模式図で示した実線の部位で切断した。破線で囲った組織は、DRG(矢印)を示す。神経管を除去した脊髄の左側では、一部のDRGの形成が見られなかった(矢頭)。(C, D) 抗Tuj1抗体を用いた免疫染色により、皮膚性感覚神経の軸索を可視化させた。模式図には、観察したニワトリ胚の部位を示した。写真の左右のパネルは感覚神経のトレースである。矢印のエントリーポイントに由来する軸索を赤で示した。(C)の神経管除去側とコントロール側は、どちらも背側正中線をまたいだ、同一の頭尾軸レベルの視野を示す。両方の視野とも、同一面積である。コントロール側の視野では、3つのエントリーポイントが見られるのに対して、神経管除去側では、1つのエントリーポイントしか見られなかった。神経管除去側に見られるエントリーポイントから伸長した感覚神経軸索は、本来隣接した感覚神経が占有したであろう頭側の領域(トレースの白枠で囲った部分)に、侵入していた。一方、それに対となるコントロール側の感覚神経は、頭側に隣接した感覚神経の領域(トレースの白枠で囲った部分)には、侵入していなかった。(D) コントロール側の感覚神経が、エントリーポイント(矢印)から、背側正中線(破線)を大きく越えて、左側の本来対面の感覚神経が占める領域(トレースの白枠で囲った領域)に、侵入していた。Sp: spinal cord 脊髄。

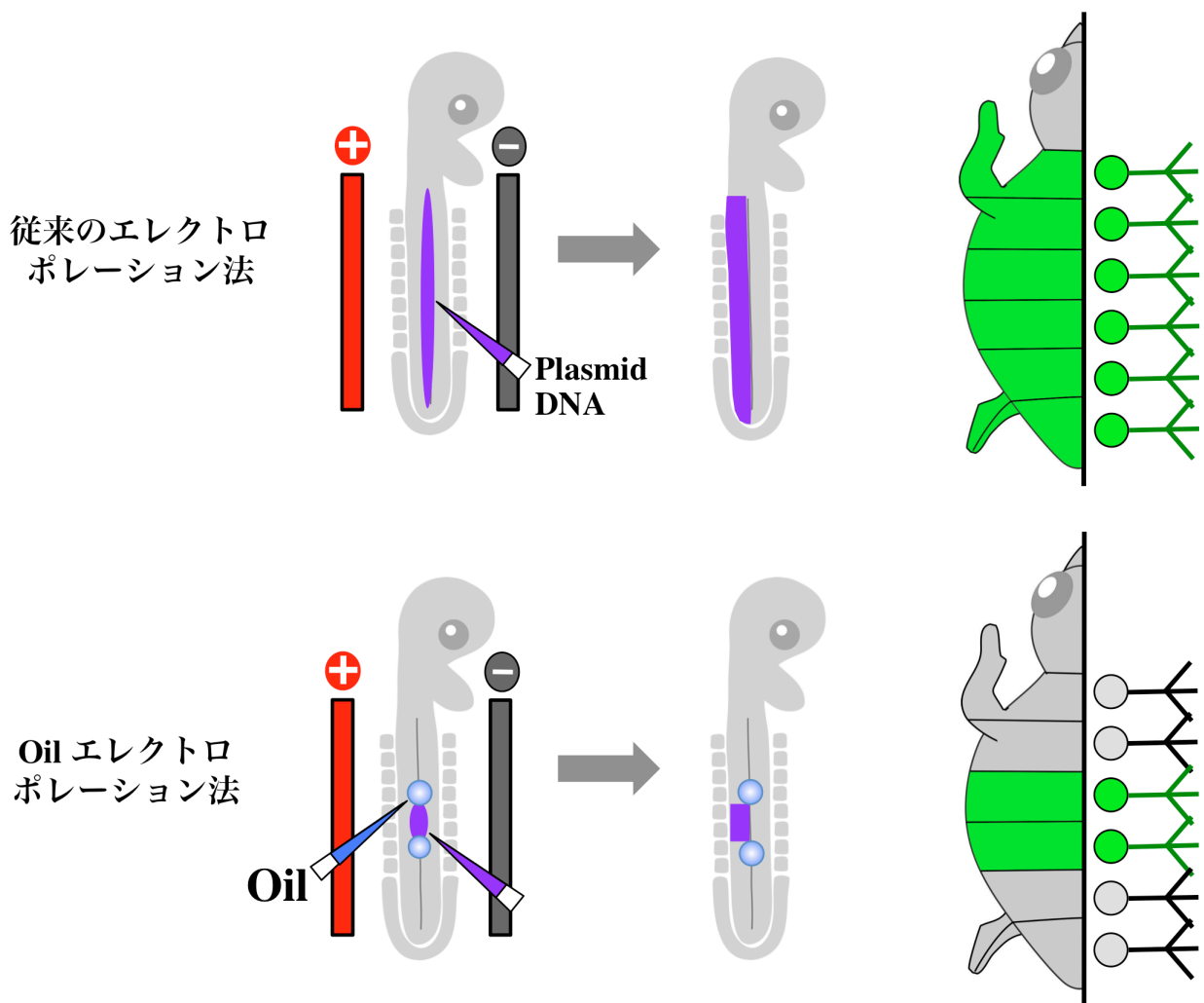


図18. 本研究の第二部で確立した新規遺伝子操作法を要約した模式図

従来のエレクトロポレーション法では、神経管に注入したプラスミド溶液はすぐさま拡散するため、頭尾軸のどのレベルの神経管にも遺伝子は導入される。一方、Oilエレクトロポレーション法では、プラスミド溶液の拡散が防がれるため、特定レベルの神経管のみに遺伝子は導入される。その結果、遺伝子操作した感覚神経の区画とそうでない区画に明確な境界を設けることが可能となった。遺伝子が導入された区画とDRGを緑色で示した。

# 考察

## 第一部

本研究で私は、発生過程の NCC に由来する組織／細胞種において、ゲノムに組み込ませた遺伝子を、永続的にあるは薬剤依存的に操作する手法を確立した(図 11)。これらの手法の有用性は、3 次元環境下において、DsRed2 でラベルした軸索、EGFP でラベルしたシュワン細胞の同時観察により立証した。この前例のないアプローチにより、末梢組織において軸束に付随したシュワン細胞のふるまいと活動の新たな様子を記載した。

本研究で、4 種類の手法を確立した。1 つ目の Tol2 に依存したゲノムへの遺伝子導入法は、NCC 由来の組織／細胞種を含む細胞において、エレクトロポレーションされた遺伝子の発現を、永続的に誘導させることを可能とした(図 11A)。この永続的な遺伝子発現は、中枢神経系の細胞とは異なり、NCC のように細胞分裂が盛んで、ゲノムに挿入されない遺伝子は急速に消えてゆく細胞種に、特に有効である。2 つ目は、Tol2 法とゲノムに組み込まれた遺伝子を NCC 特異的に誘導する、本研究で同定した NCC-enhancer (enhancer<sup>41</sup>)を合わせた手法である。この手法は、例えば運動神経のように、感覚神経あるいはシュワン細胞など、NCC 由来細胞種と分別して遺伝子操作する必要がある場合に、特に有効である(図 11B)。3 つ目には、Cre/loxP を介した DNA の組み替えにより、発生後期まで、Sox10 エンハンサーの活性の低下によらず、NCC 由来組織／細胞種で特異的に永続的に遺伝子操作する、更なる利点が加わった(図 11C)。4 つ目、この手法に、更に tet-on 法を組み合わせることで、NCC 発生過程の任意の時期に、ゲノムに組み込ませた遺伝子の発現誘導を可能とした(図 11D)。これより、外来遺伝子を発生後期の NCC に由来する組織／細胞種において、条件的に遺伝子操作することが可能となった。最後に、この手法を活用することで、in vivo/ex vivo において、軸索に付随するシュワン細胞を、1 細胞レベルで可視化することに成功した。これより、これまで報告になかった、発生段階に依存したその振る舞いを示した。本研究により、これまで長らく未解決であった、どのように NCC の発生は制御されているのかという疑問に、細胞あるいは分子レベルで解析する新規の手法が確立された。本研究で記述した手法の原理はまた、組織特異的なエンハンサーを利用することで、胚発生に見られる他の細胞においても適用されうるだろう。

### **Tol2-Cre/loxP 法のアドバンテージ**

Tol2 により媒介されたゲノムへの遺伝子組み込みは、さまざまなモデル器官形成において、強力な遺伝子スクリーニング技術として利用されてきた。特にゼブラフィッシュでは、遺伝子あるいはエンハンサートラッピングに用いられており、この他 Tol2 法は、カエルあるいはマウスにおいても有効である (Kawakami, 2005)。近年、当研究室の佐藤等により、ニワトリ胚でも、Tol2 法と CAGGS を用いて、発生後期の組織（例えば、体節由来組織、網膜など）に、遺伝子を発現させることが可能になった (Sato et al., 2007)。一方、Cre/loxP 法は loxP 配列特異的な相同組み換え現象を利用する、組織／細胞種特異的な遺伝子発現制御法として確立されており (Nagy, 2000)、ニワトリ由来の培養細胞あるいは、ニワトリ胚の生体内細胞において機能することが示されていた (Ma et al., 2004; Buelow and Scharenberg, 2008; Lu et al., 2009; Avraham et al., 2009)。これらの技術を統合した、本研究のニワトリ胚 Tol2-Cre/loxP 法は、リネージトレース、注目した組織以外での遺伝子操作による胚致死や奇形の回避、あるいは細胞種特異的な遺伝子機能の解析などのアドバンテージを兼ね備えた、羊膜類における高効率遺伝子スクリーニング技術と言える。

### **Tol2-Cre/loxP-tet-on 法のアドバンテージ**

これまで、ニワトリ胚では、PgyBac トランスポゾンと Cre/loxP 法を併用し、CAGGS に発現されるタモキシフェン誘導型 Cre を用いた、時期特異的な遺伝子操作法が確立されている (Lu et al., 2009)。これよりも更に発展した技術として、本研究の Tol2-Cre/loxP-tet-on 法は、トランスポゾンを用いた細胞種特異的かつ時期特異的な遺伝子発現操作法と位置づけられる。この方法は、tet-on 法を併用したことで、更なる利点を生んでいる。興味ある遺伝子の時期特異的な影響を解析可能であることに加えて、その影響があった細胞を確実に標識することが可能である。tet-on 法では、両方向に転写活性を持つ TRE-BI プロモーターが使われている。これは、興味のある遺伝子と同時に蛍光タンパク質(EGFP など)を発現させる両方向性のプロモーターである (Watanabe et al., 2007; Sato et al., 2002; Ohata et al., 2009)。Dox 誘導により解析対象の遺伝子と蛍光タンパク質は、同一の細胞に発現されるため、その影響を受けた生きたままの細胞のふるまい、例えば細胞の移動、形態変化、細胞死、細胞分裂などが、遺伝子操作をしつつ解析可能である。

### **Sox10 遺伝子座近隣に見いだされたエンハンサー領域**

これまで、ニワトリでは、本研究と同様に ptk-EGFP ベクターとエレクト



トロポレーション法を用いたレポーター解析から、*Sox10* のエンハンサーの検索がなされてきた。頭部領域にレポータープラスミドを導入した際に、CNS3 を含む 5kb の領域は E2 の遊出前の NCC において若干のエンハンサー活性を持つことが示されていた (Betancur et al., 2010)。本研究では、新たに CNS3 を含む 3.6kb の enhancer<sup>41</sup> 領域が E2.5 において、体幹部の NCC 特異的に活性化することを示し(図 4B, D, E; 表 2)。さらに、その活性は発生の経過に伴って減衰することを示した(図 5)。

in silico による解析から、ヒトとニワトリのゲノムにおいて見いだされた CNS3 は、マウスにおいても保存されている。マウスでは、レポーター遺伝子と基本転写配列上流に CNS3 を位置させた、トランスジェニックマウスによる解析から、それ単独で十分に体幹部領域の NCC に活性化することが示されていた (Deal et al., 2006; Werner et al., 2007; Antonellis et al., 2008)。しかしながら、本研究のとおり、enhancer<sup>41</sup> を短くした CNS3 を含む #4-5 ゲノム断片では、体幹部領域の NCC における、エンハンサー活性が観察されなかった。また、#4-1 を短くした CNS3 を含まない #4-2 ゲノム断片でも、エンハンサー活性は、検出されなかった。(図 4B; 表 2)。これより、ニワトリでは、体幹部での NCC 特異的なエンハンサー活性は、CNS3 と #4-2 ゲノム断片に含まれる非保存領域との協調作用により、生じていると推測される。

#### 4-1 領域以外のエンハンサー活性が見られた領域

保存領域を含まない #1-4 ゲノム断片は、#4-1 に対して比較的強い活性が NCC で見られた。また、神経管で、高頻度に活性を示す領域であった(図 4B, D and E; 表 2)。しかしながら、*Sox10* mRNA は先述した通り E2.5 の神経管では発現しない(図 4A)。従って、#1-4 領域を完全に含みそれと同様なエンハンサー活性が見られた #1 領域 (8kb) の外部に、神経管で *Sox10* の遺伝子発現を抑制するリプレッサー領域が、存在すると推測される。実際に、このような例として、転写因子の *Sox2* mRNA の発現を、神経板のみに規定するリプレッサー領域が、存在することが報告されている (Takemoto et al., 2006)。また、#8 ゲノム断片は先行論文で示された、体幹部の NCC においてエンハンサー活性をもつ *Sox10E1* 領域(本研究の UTR1 に相当する領域)を含む、7.5kb の領域である (Betancur et al., 2010)。しかしながら、本研究では #8 ゲノム断片には、エンハンサー活性が見いだされなかった(表 2)。従って、#8 ゲノム断片には、*Sox10E1* の体幹部 NCC のエンハンサー活性を抑制するリプレッサー領域が、存在すると推測される。

#### 新規技術を用いた NCC 発生メカニズムの発展

NCC は、発生過程においてしばしば周辺組織と相互作用する (Le Douarin, 1999; Goldstein et al., 2005)。特に、NCC に由来する末梢神経系と、神経管に由来する中枢神経系の相互作用は、神経管を除去するなどの胚操作により、古くから知られてきた (Teillet and Le Douarin, 1983; Kalcheim and Le Douarin, 1986; Landmesser and Honig, 1986; Tosney and Hageman, 1989)。このような相互作用に働く分子メカニズムは、末梢神経と中枢神経を個別に遺伝子操作することで、初めて明るみになる。従来通りの CAGGS プロモーターを用いた Tol2 法では、Tol2-CAGGS-Gene プラスミドを神経管に導入させるため、どうしても中枢神経での遺伝子発現を除外することは、困難であった(図 3B)。これに対して、*enhancer*<sup>41</sup>を用いた Tol2-Cre/loxP 法では、プラスミドを神経管導入させても、遺伝子は末梢神経系特異的に発現される。従って、この新しい技術により、発生過程における末梢神経系と中枢神経系の組織間相互作用が、明らかになると期待される。この技術に tet-on 法を組み合わせると、さらに解析の幅は広まる。発生過程に働く分子は、しばしば異なる発生段階において、違った役割をはたす (Knecht and Bronner-Fraser, 2002; Sauka-Spengler and Barembaum, 2008; Dorsky et al., 1998; Lee et al., 2004; Shah et al., 1996; Kos et al., 2001; Sasai et al., 2001; Thomas and Erickson, 2009; Hong and Saint-Jeannet, 2005)。例えば興味ある遺伝子が、初期 NCC の発生に強く影響を与える分子であった場合は、NCC の発生に異常がきたされ、その後の末梢神経系における役割が解析不能となる。*enhancer*<sup>41</sup>を用いた Tol2-Cre/loxP-tet-on 法ならば、そのような遺伝子は、NCC が末梢神経系へ分化した段階で発現させられる。従って、末梢神経系の発生段階に合わせた、中枢神経系との組織間相互作用メカニズムが、明らかになると期待される。

### 胚発生にともなうシュワン細胞のふるまい

これまで、軸索に付随するシュワン細胞のふるまいを報告した全ての研究では、*in vitro* の培養細胞が使われていた。これらは、低密度に軸索に接したシュワン細胞の観察であり、*in vivo* とは、大きく異なる状況であった (Yu et al., 2009)。若いシュワン細胞から突出したいくつかのフィロポディア様の突起は、観察されてはいたが、それらの活性の停止あるいは、細胞伸長の時間経過には、注意が払われていなかった。通常エンブリオの環境では、若いシュワン細胞の活動は、細胞の突起は、不定形な細胞と類似しており、成熟するにつれて、密接に会合し軸索束の表面を満たすシュワン細胞が増加する。その結果、細胞突起の突出は停止することが、本研究の発見から考えられる。1 細胞レベルのシュワン細胞を *ex vivo* で可視化することが、本研究で述べた技術の長所により、初めて可能となった。これより、*in vivo* において、軸索に近接したシュワン細胞

の発生に新しい洞察を与えた。また、本研究の発見から、実際の体内におけるNCCの研究が、重要であることを強調する。

### 他の組織発生解析への応用

Tol2-Cre/loxP法では、Creの発現に依存してストップカセットは除去され、目的遺伝子が発現される(図6B)。本研究では、NCC特異的に遺伝子を発現させるため、Cre発現ドライバーにNCC-enhancerを用いた。この手法の原理は、他の組織発生の解析に応用することが可能だろう。ptk-Cre ベクターのtkプロモーターの上流に挿入したenhancer<sup>41</sup>の代わりに、目的とする組織特異的に活性化するエンハンサーを挿入することで、容易にNCC以外の組織/細胞種特異的に遺伝子を発現させられる。目的の組織に特異的なエンハンサーには、エンハンサーの活性パターンがしばしば種間を越えて保存されていることから(Uemura et al., 2005)、マウスやゼブラフィッシュなどニワトリ以外の生物種で報告されたエンハンサーが利用可能と考えられる。また、組織特異的なエンハンサーの報告がなされていなくても、ニワトリでは、本研究でも立証したように、内川等(Uchikawa et al., 2003)の手法により、ニワトリとほ乳類のゲノム比較による非コード保存領域の推定と、エレクトロポレーション法を用いる手法で、簡便にエンハンサースクリーニングを行い、組織特異的な遺伝子操作に利用することが可能であろう。

## 第二部

NCC由来組織の一つである、皮膚性感覚神経の区画化は、熱や圧力などの外的刺激が体表のどこに与えられたのかを認識する皮膚感覚の獲得に極めて重要な役割をはたす(Sagasti et al., 2005)。このような区画の形成は、カエル、ニワトリ、イモリあるいはラットなどのモデル脊椎動物を用いて外科的にDRGを除去する実験から、隣接したDRG由来の感覚神経の競合が重要であると考えられてきた。これまで競合作用の分子機構の解明に向けて、生体外での解析が行われており、分泌性反発分子と細胞外マトリクスの寄与が予想されている。しかしながら、生体内におけるその分子機構へのアプローチは、未だなされていない。本研究は、感覚神経区画化の分子機構の解明を先に見据えて、生体内における実験系の確立を試みた。このため、2次元的に皮膚性感覚神経を捉えることが技術的に容易なニワトリ胚の胴体部に着目し、以下の3点を明らかにした。1) 感覚神経は、E7において背側全体を覆う。2) E9には、背側の体表に、皮膚性感覚神経の区画が形成されている。3) 背側の区画形成にも皮膚性感覚

神経の競合が働く。これらの見解を得る過程で、私は特定レベルのDRGに由来する感覚神経に限局して、遺伝子操作／ラベルするOilエレクトロポレーション法を確立した(図18)。これより、生体内において、感覚神経の区画形成を解析する実験系が確立された。今後は、生体内における感覚神経の区画形成機構の解明が期待される。

### ニワトリ胚胴体部の背側は皮膚性感覚神経の区画化の解析に有効である

これまでニワトリ胚をもちいた皮膚性感覚神経の区画形成の研究では、四肢の区画をモデルに、電気生理学な手法を使った解析がなされてきた。しかしながら、感覚神経軸索の分布を捉えるため、その表皮を無傷のまま2次元に展開することは、四足が複雑に湾曲しているため、困難であった (Wang and Scott, 2002; Scott, 1984; Scott, 1982)。そこで私は、皮膚性感覚神経の区画形成の解明に向けて、ニワトリ胚の胴体部の背側に着目した。ニワトリ胚胴体部の背側はほぼ平坦であるため、はぎ取った表皮を2次元に展開することが容易である。実際に、胴体部の皮膚を2次元に展開することで、無傷のまま皮膚性感覚神経の分布を、軸索1本のレベルまで高解像度に捉えることが可能となった(図13)。

胴体部背側の皮膚性感覚神経は、極めて単純な区画を形成する。DiIとDiOを頭尾に並ぶDRGへ交互に注入すると、背腹軸に広く頭尾軸にせまく分布したDiIあるいはDiO陽性の感覚神経が、頭尾軸にそって(あたかも、長方形のタイルが並ぶように)分節状に見られた(図14)。また、はぎ取った皮膚には、感覚神経軸索の束がDRGから皮膚へと到達したエントリーポイントが見られ、そこから軸索束は枝分かれし神経網を形成していた。このエントリーポイントを基点にすると、遺伝子操作の影響で乱れた区画が、頭尾あるいは背腹へどれほど拡張／縮小したのかを、定量することが可能と予想される。

加えて本論では、背側の区画形成にも四足と同様に、感覚神経の競合が働くことを示した。Nogginの強制発現あるいは外科的に胸部の神経管を除去することで、四足部と同様に本来形成されるはずの感覚神経が支配したであろう区画に、隣接した感覚神経が侵入した(図16, 図17)。ゼブラフィッシュの頭部領域を支配する三叉神経に由来する皮膚性感覚神経の区画形成にも、隣接間の神経同士の競合が働く (Sagasti et al., 2005)。これより、脊椎動物における全身の皮膚性感覚神経の区画形成には、競合をはじめとした共通の分子機構が働くと推測される。以上のことから、ニワトリ胚の背側は、羊膜類の皮膚性感覚神経の区画形成を解析するうえで、極めて有効なモデルと言える。

## Oilエレクトロポレーション法は区画形成機構の解析に有効である

感覚神経の区画形成は、古くから研究がなされてきた (Cajal, 1919; Scott, 1984)。しかしながら、その分子機構は、依然として明らかにされてこなかった。この主な原因は、特定の区画を遺伝子操作する技術が、確立されていなかったことにある。区画形成の分子機構を解析するには、遺伝子操作した DRG に由来する感覚神経軸索の頭尾軸および、背腹軸に沿った分布を明確に観察することが望まれる。それには、遺伝子操作/ラベルした DRG に由来する感覚神経軸索と、そうでない軸索に明瞭な境界を設ける必要がある。Oil エレクトロポレーション法は、頭尾軸に分節的に形成される DRG のうち、特定レベルの DRG に遺伝子操作/ラベルすることを可能とした(図 15B,C, 図 18)。従って、Oil エレクトロポレーション法は、感覚神経の区画形成の理解に貢献する画期的な遺伝子操作法と言える。

本論では、特定レベルより尾側の感覚神経を操作する結果を図15 B,C で示した。解析には、それらのうち最も頭側の感覚神経を観察し、どれほど頭尾左右に伸縮するのかを定量化する。理想的な解析は、同時に遺伝子操作された尾側の感覚神経による2次的な影響と、同色でラベルされたそれらの分布を間違えて定量化する恐れを排除することである。従って、1区画の感覚神経を特異的に遺伝子操作/ラベルすることが望まれる。Oilエレクトロポレーション法は、図16で示したように、Oilを2つ用いることで、図15B,Cより更に限局した頭尾軸レベルの感覚神経に遺伝子を導入させることが可能である。このため、1体節分の神経管に限局して遺伝子を導入させる試みを行っている。現在、1体節分の神経管へ遺伝子を導入させることで、2のDRGに限局して遺伝子操作/ラベルさせることに成功している。1体節分神経管に由来するNCCの3割は隣接した体節へと移動しDRGを形成する (Le Douarin, 1999)。従って、1つのDRGに限局して遺伝子操作するには、0.7体節分以下の神経管へ遺伝子を導入させることで可能になると期待している。

## 感覚神経区画化の分子機構

およそ1世紀も前に、Cajal, (1919)は組織学的な解析から、伸長途中にある皮膚性感覚神経の競合が、感覚神経の区画形成に働くといった仮説を提唱した。後にこの説は、カエルやイモリの外科的操作により、除去した感覚神経の領域に、隣接した感覚神経が侵入したことから裏付けされた (Davis and Constantine-Paton, 1983b; Kitson and Roberts, 1983)。ニワトリ胚においても、外科的に腰部のDRGを除去することで、腰から足先における皮膚性感覚神経の区画形成に競合が働くことが示唆された (Scott, 1984)。加えて、本研究では、ニ

ワトリ胚胸部の背側における皮膚性感覚神経においても、感覚神経同士の競合が働くことを、Nogginの強制発現、および外科的に胴体部の神経管を除去することで示した(図16, 図17)。これらの見解は、体表のどの部位においても、Cajal, (1919)が提唱した感覚神経の競合が、区画形成に働くことを示唆する。

では、感覚神経の競合にはどのような分子メカニズムが働くのか？その答えの一つとして、反発性の分泌因子が予想される。実際、コラーゲンマトリゲルを用いて2つのDRGを3次元培養すると、DRGから伸長した軸索は接触を伴わず反発する (Montazeri and Skutella, 2003)。一方、分泌性因子が拡散しやすい、2次元培養下においては、それぞれのDRGから伸長した神経軸索は、DRGの付近では接触を伴わず屈曲し、DRGの遠方では接触し伴走する様子が見られた。これより、分泌性反発因子の濃度勾配に依存して感覚神経の競合は生じるであろうと予想されている (Hari et al., 2004)。生体内では、DiIとDiOでラベルした隣接間の皮膚性感覚神経の境界部を注意深く観察すると、DiIとDiOで標識された感覚神経の軸索同士は接触し同一経路を並走する様子が見られた(図14D-F)。これらの見解から、生体内でも分泌性反発因子の働きにより、感覚神経は競合すると予想される。一方で、分泌性反発因子と同時に、細胞膜に局在する接着性の反発分子が働く可能性も考えられる。接着性反発分子Ephrin/Ephをそれぞれ発現するDRGと運動神経を共培養すると、互いの神経は接触した後に伴走する (Gallarda et al., 2008)。以上のことから、感覚神経の競合には、分泌性と接着性の反発分子が、強制的に働くと予想される。以下に、区画形成に働く反発性分泌因子と接着性分泌因子の具体的な分子について考察する。

### 分泌性反発性因子

神経系に働く主要な分泌性反発因子 (以下にリガンド/レセプターを表記する)としてRoundabout (Robo)/Slit, Neuropilin-Plexin/Semaphorin (Sema), Deleted in colorectal cancer (DCC)- UNC5/Netrinが知られている (Guan and Rao, 2003; Bashaw and Klein, 2010)。ラットのDRGでは、複数種のリガンド(Slit-2, Netrin-1, Sema3A, Sema3Cなど)とレセプター ( Robo, DCC, neuropilin1と2, PlexinA1-3など) の発現が見られる (Montazeri and Skutella, 2003)。ところが、Neuropilin1とNeuropilin2に対する阻害抗体を混入させたコラーゲンマトリゲルを用いて2つのDRGを培養しても、神経軸索が交わることはないため、それらの因子は感覚神経同士の反発に不必要であることが示された。また、Netrin-1とSlit-2を同時にトランスフェクションさせた HEK293細胞をDRGと共培養させても、DRGから伸長した軸索がHEK293細胞に反発されないことから、Netrin-1とSlit-2は神経軸索の反発に不十分であることが示された。これより、

感覚神経同士の反発には、複数の分泌性反発シグナルが強調的に働く必要があるのではないだろうか (Montazeri and Skutella, 2003)。あるいは、これまで神経系には報告されていない、分泌性反発因子が働きうるのかもしれない。

## 膜局在型反発分子

### ephrin/Eph

リガンドのephrinとそのレセプターのEphは、感覚神経の伸長反発に働く膜局在型分子として知られている。ラットの新生児のDRGには、Eph-Aの発現が見られる。その時期に、表皮では、ephrin-A4が発現しており、感覚神経の表皮への侵入は見られない。しかし、外傷が与えられた後に治癒した表皮では、ephrin-A4の発現が減少する。このとき、感覚神経は治癒した表皮に侵入する (Moss et al., 2005)。また、ニワトリ胚では、ちょうど背側の表皮に感覚神経が伸長するころ、Eph-Aの発現がDRGに見られる。この時期に、ephrinA5を後足の表皮に強制発現させると、その表皮における感覚神経の伸展が阻害される (Munoz et al., 2005)。これらのことから、ephrin/Ephシグナルは感覚神経の伸長を阻害すると予想される。ニワトリ胚のDRGでは、EphrinAとEphAはともに発現が見られることから (Munoz et al., 2005; Marquardt et al., 2005)、ephrin/Ephシグナルが感覚神経の競合に働く可能性は、十分にありと期待される。

### DSCAM

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するDSCAMは、ハエでは、2万を越えるスプライシングバリエントが存在する。これらは、同一のバリエント同士に限って強い同種間の結合が見られる (Schmucker and Chen, 2009; Schmucker, 2007; Wojtowicz et al., 2004) DSCAMの機能が失われると、嗅覚の樹上突起が占める領域は減少することから、DSCAMは樹上突起の反発に働くことと予想されている (Zipursky et al., 2006; Zhu et al., 2006)。ハエの感覚神経は、いくつかのサブタイプに分かれており、同一タイプの感覚神経では、互いに重なり合わず、固有の神経支配領域を有する。一方、異種タイプの感覚神経は、重なりあう。同一バリエントのDSCAMを異種タイプの感覚神経に強制発現させると、異種タイプの感覚神経の重複は激減する (Soba et al., 2007)。これより、DSCAMは感覚神経の神経支配領域を決める反発因子として、重要な役割をはたすと考えられる。

一方、脊椎動物には、DSCAMのスプライシングバリエントはない (Schmucker and Chen, 2009)。その機能は、網膜において報告がなされている。ハエの感覚神経と同様に網膜神経もいくつかのサブタイプが存在する。同一サ

ブタイプの網膜神経細胞を見ると、その細胞体は一定の距離をおいて整然と配置しており、そこから放射状に枝分かれした神経突起が形成される。DSCAM変異マウスでは、神経突起の長さや突起の数は野生型と同様であったが、枝分かれした突起の数は減少する(自己の突起同士が束になっていた)。また、網膜神経細胞の配置が乱れたことから、DSCAMは、網膜神経細胞の配置と神経突起の枝分かれに、必須であることが示された。これらのことから、DSCAMの反発作用により、網膜神経細胞の突起は放射状に広がり、隣接した細胞は距離を取り合うことで、それらは整然と配置すると推測されている (Fuerst et al., 2008)。このように、神経が特定領域を支配することに寄与するDSCAMは、DRGにもmRNAの発現が見いだされており (Yamakawa et al., 1998)、皮膚性感覚神経の区画形成に働く可能性がある。

### 区画化における感覚神経の周辺組織の役割

感覚神経は間充織で満たされた真皮境界部の付近を伸展する (Inoue and Mihara, 2004)。こうした感覚神経の周辺組織は、区画形成にどのような役割を果たすのだろうか？一つの可能性として、細胞外マトリクスが感覚神経の反発分子の機能を調節することが考えられる。lamininを始めとする種々の細胞外マトリクスでコートしたディッシュ上において、2つのDRGを培養すると、それぞれから伸長した神経は、lamininコートのディッシュのみにおいて、反発する (Hari et al., 2004)。lamininは、網膜神経細胞においてnetrin-1に対する応答を調節することが知られており、網膜神経はlaminin非存在下ではnetrin-1に誘引され、laminin存在下では逆に反発される。このような、網膜神経のNetrinに対する応答は、lamininが細胞内のcAMPの濃度を調節することにより、切り替わることが示唆されている (Hopker et al., 1999)。実際に、網膜神経細胞は、細胞内のcAMPの量が多いとNetrin-1に誘引され、少ないと反発される。lamininはそのレセプターのintegrinを介して細胞内にシグナルを伝える。 $\beta$ 1-integrinを介したfibronectinのシグナルは、cAMPの濃度を低下させることが、T-Cellを用いた解析により示されている (Hauzenberger et al., 1994)。以上のことから、laminin/integrinシグナルは、神経細胞において cAMP量を調整することで、そのNetrin-1に対する誘引反発応答を切り替えているのではないだろうか。このように、細胞外マトリクスを始めとした周辺組織は、反発性分泌因子の働きを切り替える役割があると推測される。

### 区画化に関連する因子のスクリーニング



ニワトリ胚では、およそE5からE6にかけて、DRGから感覚神経束が真皮に到達する。その後、神経束の周辺に感覚神経軸索が神経網を形成する。区画形成に働く因子のスクリーニングでは、DRGから神経束が到達する時期までの遺伝子操作の影響を避けるため、Dox依存的に遺伝子が発現されるTol2-tet-on法を用いる。E6以降の遺伝子操作により、遺伝子操作した神経に異常な伸長あるいは分布がみられる遺伝子を特定する。さらに、観察されたフェノタイプが運動神経や脊髄が遺伝子操作されたために生じた2次的な影響によるものかを検証するため、enhancer<sup>41</sup>を用いたTol2-Cre-tet-on法を用いる。このように、一次的なスクリーニングでは、遺伝子の発現効率が高いTol2-tet-on法で、感覚神経の区画形成に働く因子に目星をつける。そして、Tol2-Cre-tet-on法で中枢神経からの2次的な影響を排除することで、皮膚性感覚神経の区画形成に働く因子を特定する。しかしながら、enhancer<sup>41</sup>を用いたTol2-Cre-tet-on法では感覚神経のみに与えられた遺伝子の影響を見るには不十分と考える。なぜなら、enhancer<sup>41</sup>を用いたTol2-Cre-tet-on法では、NCCに由来する組織は感覚神経の他、それに付随するシュワン細胞や表皮に存在する色素細胞に遺伝子が発現されるからである(図10A)。このため、将来的には、感覚神経特異的に活性化するエンハンサーを利用し、感覚神経のみに与えられた遺伝子の影響を検討したい。

## 謝辞

ptk-EGFPベクターは近藤寿人教授(大阪大学)より供与いただきました。  
pxCANC<sub>Cre</sub>とpCALNL5は齋藤泉教授(東京大学)より供与いただきました。  
pRSET-B tdTomatoはRoger Y. Tsien博士(現・UCSD)より供与いただきました。  
pCAGGS-Nogginは齋藤大介助教(同研究室)より供与いただきました。中川真一博士(現・理研)と榎本和生博士(現・大阪バイオサイエンス研究所)には、研究内容に関するアドバイスやサイエンスについて非常に丁寧なご指導を頂きました。

本学の分子発生生物学講座のみなさまには、多大なサポートをいただき、今日までの研究生活を続けていくことができました。齋藤大介助教には、エレクトロポレーション実験、エンハンサーの単離など研究全般についてのテクニカルな指導とディスカッションを、田所竜介助教には、タイムラプス観察を、佐藤有紀博士(現・熊本大学准教授)には、Tol2-トランスポゾンシステムに関して、渡邊忠由博士(現・UCSF)には Tet-on system を、それぞれご指導・ご助言いただきました。酒井大輔研究員、大畑絵美博士(現・ライカマイクロシステムズ)、吉野剛史さんにはたくさんのディスカッションとご助言をいただきました。安江泰治さんには、細胞培養をご指導いただきました。金井賢一さんにはウェスタンブロッティングをご指導いただきました。内山朱美さんには、コンピューター操作をサポートしていただきました。

片岡浩介准教授、影山裕二博士(現・基礎生物学研究所)、荻野肇准教授、越智陽城助教には、さまざまなご助言をいただくとともに、本学での学生生活をサポートしていただきました。

私は、本学 COE・リサーチアソシエイトに採用され、研究生活をバックアップしていただきました。最後に、高橋淑子教授には、本学に入学してから6年の間、研究全般と学生生活に関して、たくさんのご指導とさまざまな貴重な機会を与えていただきました。

以上のたくさんの方々に、この場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- Abremski, K., and Hoess, R.** (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of biological chemistry* 259, 1509-1514
- Aldskogius, H., Berens, C., Kanaykina, N., Liakhovitskaia, A., Medvinsky, A., Sandelin, M., Schreiner, S., Wegner, M., Hjerling-Leffler, J., and Kozlova, E.N.** (2009). Regulation of boundary cap neural crest stem cell differentiation after transplantation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 1592-1603
- Allan M. Goldstein, K.C.B., Adele M. Doyle, , and Nandor Nagy, D.J.R.** (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mechanisms of development* 122, 821-833
- Antonellis, A., Huynh, J.L., Lee-Lin, S.Q., Vinton, R.M., Renaud, G., Loftus, S.K., Elliot, G., Wolfsberg, T.G., Green, E.D., McCallion, A.S., et al.** (2008). Identification of neural crest and glial enhancers at the mouse Sox10 locus through transgenesis in zebrafish. *PLoS genetics* 4, e1000174
- Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y.H., Credidio, C., and Saint-Jeannet, J.P.** (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Developmental biology* 259, 19-33
- Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., and Klar, A.** (2009). Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1. *Neural development* 4, 21
- Balemans, W., and Van Hul, W.** (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Developmental biology* 250, 231-250
- Bashaw, G.J., and Klein, R.** (2010). Signaling from axon guidance receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001941

**Betancur, P., Bronner-Fraser, M., and Sauka-Spengler, T.** (2010). Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 3570-3575

**Bettters, E., Liu, Y., Kjaeldgaard, A., Sundstrom, E., and Garcia-Castro, M.I.** (2010). Analysis of early human neural crest development. *Developmental biology* *344*, 578-592

**Bhattacharyya, A., Brackenbury, R., and Ratner, N.** (1994). Axons arrest the migration of Schwann cell precursors. *Development (Cambridge, England)* *120*, 1411-1420

**Buelow, B., and Scharenberg, A.M.** (2008). Characterization of parameters required for effective use of tamoxifen-regulated recombination. *PloS one* *3*, e3264

**Cajal, R.y.** (1919). Action neurotropica de los epitelios. *Studies in Vertebrate Neurogenesis*, 149-200

**Cheng, Y., Cheung, M., Abu-Elmagd, M.M., Orme, A., and Scotting, P.J.** (2000). Chick sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain research* *121*, 233-241

**Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P.** (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* *8*, 1323-1326

**Davis, M.R., and Constantine-Paton, M.** (1983a). Hyperplasia in the spinal sensory system of the frog. I. Plasticity in the most caudal dorsal root ganglion. *The Journal of comparative neurology* *221*, 444-452

**Davis, M.R., and Constantine-Paton, M.** (1983b). Hyperplasia in the spinal sensory system of the frog. II. Central and peripheral connectivity patterns. *The Journal of comparative neurology* *221*, 453-465

**Deal, K.K., Cantrell, V.A., Chandler, R.L., Saunders, T.L., Mortlock, D.P., and Southard-Smith, E.M.** (2006). Distant regulatory elements in a Sox10-beta GEO BAC transgene are required for expression of Sox10 in the enteric nervous system and other neural crest-derived tissues. *Dev Dyn* 235, 1413-1432

**Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W.** (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396, 370-373

**Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Goncalves-Trentin, A., and Le Douarin, N.M.** (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *Comptes rendus biologiques* 330, 521-529

**Fuerst, P.G., Koizumi, A., Masland, R.H., and Burgess, R.W.** (2008). Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. *Nature* 451, 470-474

**Funahashi, J., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., and Nakamura, H.** (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Development, growth & differentiation* 41, 59-72

**Gallarda, B.W., Bonanomi, D., Muller, D., Brown, A., Alaynick, W.A., Andrews, S.E., Lemke, G., Pfaff, S.L., and Marquardt, T.** (2008). Segregation of axial motor and sensory pathways via heterotypic trans-axonal signaling. *Science (New York, NY)* 320, 233-236

**Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., and Roberts, D.J.** (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mechanisms of development* 122, 821-833

**Guan, K.L., and Rao, Y.** (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956

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

- Hamilton, D.L., and Abremski, K.** (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *Journal of molecular biology* 178, 481-486
- Hari, A., Djohar, B., Skutella, T., and Montazeri, S.** (2004). Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth. *Int J Dev Neurosci* 22, 113-117
- Haupt, C., Kloos, K., Faus-Kessler, T., and Huber, A.B.** (2010). Semaphorin 3A-Neuropilin-1 signaling regulates peripheral axon fasciculation and pathfinding but not developmental cell death patterns. *The European journal of neuroscience* 31, 1164-1172
- Hauzenberger, D., Klominek, J., and Sundqvist, K.G.** (1994). Functional specialization of fibronectin-binding beta 1-integrins in T lymphocyte migration. *J Immunol* 153, 960-971
- Himly, M., Foster, D.N., Bottoli, I., Iacovoni, J.S., and Vogt, P.K.** (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248, 295-304
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S.** (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS biology* 3, e159
- Hong, C.S., and Saint-Jeannet, J.P.** (2005). Sox proteins and neural crest development. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 694-703
- Honore, S.M., Aybar, M.J., and Mayor, R.** (2003). Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Developmental biology* 260, 79-96
- Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C.** (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73

- Hsu, W., Mirando, A.J., and Yu, H.M.** (2010). Manipulating gene activity in Wnt1-expressing precursors of neural epithelial and neural crest cells. *Dev Dyn* 239, 338-345
- Inoue, T., and Mihara, M.** (2004). Sequential observation of morphogenesis of cutaneous nerve fibers in fetal rat skin: an immunohistochemical and electron microscopic study. *The Journal of investigative dermatology* 123, 763-770
- Kalcheim, C., and Le Douarin, N.M.** (1986). Requirement of a neural tube signal for the differentiation of neural crest cells into dorsal root ganglia. *Developmental biology* 116, 451-466
- Kanegae, Y., Takamori, K., Sato, Y., Lee, G., Nakai, M., and Saito, I.** (1996). Efficient gene activation system on mammalian cell chromosomes using recombinant adenovirus producing Cre recombinase. *Gene* 181, 207-212
- Kapur, R.P.** (1999). Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol* 2, 559-569
- Kawakami, K.** (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn* 234, 244-254
- Kitson, D.L., and Roberts, A.** (1983). Competition during innervation of embryonic amphibian head skin. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character* 218, 49-59
- Knecht, A.K., and Bronner-Fraser, M.** (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nature reviews* 3, 453-461
- Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., and Erickson, C.A.** (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development (Cambridge, England)* 128, 1467-1479

**Kost, R.G., and Straus, S.E.** (1996). Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention. *The New England journal of medicine* 335, 32-42

**LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M.** (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 81-112

**Landmesser, L., and Honig, M.G.** (1986). Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons. *Developmental biology* 118, 511-531

**Le Douarin, N.M., and Kalcheim, C.** (1999). *The Neural Crest*. Cambridge University Press 2nd Edition

**Lee, H.Y., Kleber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., and Sommer, L.** (2004). Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science (New York, NY)* 303, 1020-1023

**Lee, M.W., McPhee, R.W., and Stringer, M.D.** (2008). An evidence-based approach to human dermatomes. *Clinical anatomy (New York, NY)* 21, 363-373

**Lu, Y., Lin, C., and Wang, X.** (2009). PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic acids research* 37, e141

**Ma, H., Sumbilla, C.M., Farrance, I.K., Klein, M.G., and Inesi, G.** (2004). Cell-specific expression of SERCA, the exogenous Ca<sup>2+</sup> transport ATPase, in cardiac myocytes. *American journal of physiology* 286, C556-564

**Ma, L., and Tessier-Lavigne, M.** (2007). Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 27, 6843-6851

**Marmigere, F., and Ernfors, P.** (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* 8, 114-127



**Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S.E., Carter, N., Hunter, T., and Pfaff, S.L.** (2005). Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* *121*, 127-139

**Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J.R., Poliakov, A., Rubin, E.M., Frazer, K.A., Pachter, L.S., and Dubchak, I.** (2000). VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics (Oxford, England)* *16*, 1046-1047

**Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K.** (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development, growth & differentiation* *41*, 335-344

**Montazeri, S., and Skutella, T.** (2003). Secretion of intrinsic cues controls repulsion of nociceptive neurons. *Molecular and cellular neurosciences* *24*, 595-602

**Moss, A., Alvares, D., Meredith-Middleton, J., Robinson, M., Slater, R., Hunt, S.P., and Fitzgerald, M.** (2005). Ephrin-A4 inhibits sensory neurite outgrowth and is regulated by neonatal skin wounding. *The European journal of neuroscience* *22*, 2413-2421

**Munoz, L.M., Zayachivsky, A., Kunz, R.B., Hunt, J.M., Wang, G., and Scott, S.A.** (2005). Ephrin-A5 inhibits growth of embryonic sensory neurons. *Developmental biology* *283*, 397-408

**Nagy, A.** (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* *26*, 99-109

**Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y.T., Kaibuchi, K., and Takahashi, Y.** (2004). Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Developmental cell* *7*, 425-438

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

- Oakley, R.A., and Karpinski, B.A.** (2002). Target-independent specification of proprioceptive sensory neurons. *Developmental biology* 249, 255-269
- Ohata, E., Tadokoro, R., Sato, Y., Saito, D., and Takahashi, Y.** (2009). Notch signal is sufficient to direct an endothelial conversion from non-endothelial somitic cells conveyed to the aortic region by CXCR4. *Developmental biology* 335, 33-42
- Pays, L., Hemming, F.J., and Saxod, R.** (1997). Regulation of the chick cutaneous innervation pattern in retinoic acid-induced ectopic feathers and in the naked neck mutant. *The International journal of developmental biology* 41, 575-579
- Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Thiery, J.P., and Dufour, S.** (2003). The human tissue plasminogen activator-Cre mouse: a new tool for targeting specifically neural crest cells and their derivatives in vivo. *Developmental biology* 259, 176-187
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C.** (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-730
- Sagasti, A., Guido, M.R., Raible, D.W., and Schier, A.F.** (2005). Repulsive interactions shape the morphologies and functional arrangement of zebrafish peripheral sensory arbors. *Curr Biol* 15, 804-814
- Sasai, N., Mizuseki, K., and Sasai, Y.** (2001). Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 128, 2525-2536
- Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., and Takahashi, Y.** (2007). Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Developmental biology* 305, 616-624
- Sato, Y., Yasuda, K., and Takahashi, Y.** (2002). Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development (Cambridge, England)* 129, 3633-3644

- Sauka-Spengler, T., and Barembaum, M.** (2008). Gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo. *Methods in cell biology* 87, 237-256
- Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M.** (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature reviews* 9, 557-568
- Schmucker, D.** (2007). Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nat Rev Neurosci* 8, 915-920
- Schmucker, D., and Chen, B.** (2009). Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes & development* 23, 147-156
- Scott, S.A.** (1982). The development of the segmental pattern of skin sensory innervation in embryonic chick hind limb. *The Journal of physiology* 330, 203-220
- Scott, S.A.** (1984). The effects of neural crest deletions on the development of sensory innervation patterns in embryonic chick hind limb. *The Journal of physiology* 352, 285-304
- Sela-Donenfeld, D., and Kalcheim, C.** (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development (Cambridge, England)* 126, 4749-4762
- Shah, N.M., Groves, A.K., and Anderson, D.J.** (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22, 1567-1572
- Smith, W.C., and Harland, R.M.** (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840

**Soba, P., Zhu, S., Emoto, K., Younger, S., Yang, S.J., Yu, H.H., Lee, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (2007). *Drosophila* sensory neurons require Dscam for dendritic self-avoidance and proper dendritic field organization. *Neuron* 54, 403-416

**Sonnenberg-Riethmacher, E., Mische, M., Stolt, C.C., Goerich, D.E., Wegner, M., and Riethmacher, D.** (2001). Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mechanisms of development* 109, 253-265

**Southard-Smith, E.M., Kos, L., and Pavan, W.J.** (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nature genetics* 18, 60-64

**Stine, Z.E., Huynh, J.L., Loftus, S.K., Gorkin, D.U., Salmasi, A.H., Novak, T., Purves, T., Miller, R.A., Antonellis, A., Gearhart, J.P., et al.** (2009). Oligodendroglial and pan-neural crest expression of Cre recombinase directed by Sox10 enhancer. *Genesis* 47, 765-770

**Takahashi, Y., Chiba, T., Kurokawa, M., and Aoki, Y.** (2003). Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. *The Journal of comparative neurology* 462, 29-41

**Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., and Kondoh, H.** (2006). Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development (Cambridge, England)* 133, 297-306

**Teillet, M.A., and Le Douarin, N.M.** (1983). Consequences of neural tube and notochord excision on the development of the peripheral nervous system in the chick embryo. *Developmental biology* 98, 192-211

**Thomas, A.J., and Erickson, C.A.** (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development (Cambridge, England)* 136, 1849-1858

**Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N., and Takahashi, Y.** (1997). Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development (Cambridge, England)* *124*, 1975-1984

**Tonegawa, A., Kasai, T., and Takahashi, Y.** (2003). Systematic screening for signaling molecules expressed during somitogenesis by the signal sequence trap method. *Developmental biology* *262*, 32-50

**Tosney, K.W., and Hageman, M.S.** (1989). Different subsets of axonal guidance cues are essential for sensory neurite outgrowth to cutaneous and muscle targets in the dorsal ramus of the embryonic chick. *The Journal of experimental zoology* *251*, 232-244

**Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y., and Kondoh, H.** (2003). Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Developmental cell* *4*, 509-519

**Uchikawa, M., Takemoto, T., Kamachi, Y., and Kondoh, H.** (2004). Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mechanisms of development* *121*, 1145-1158

**Uemura, O., Okada, Y., Ando, H., Guedj, M., Higashijima, S., Shimazaki, T., Chino, N., Okano, H., and Okamoto, H.** (2005). Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental biology* *278*, 587-606

**Wang, G., and Scott, S.A.** (2002). Development of "normal" dermatomes and somatotopic maps by "abnormal" populations of cutaneous neurons. *Developmental biology* *251*, 424-433

**Watanabe, T., Saito, D., Tanabe, K., Suetsugu, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S., and Takahashi, Y.** (2007). Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in somitogenesis of chicken embryos. *Developmental biology* *305*, 625-636

- Werner, T., Hammer, A., Wahlbuhl, M., Bosl, M.R., and Wegner, M.** (2007). Multiple conserved regulatory elements with overlapping functions determine Sox10 expression in mouse embryogenesis. *Nucleic acids research* 35, 6526-6538
- Wojtowicz, W.M., Flanagan, J.J., Millard, S.S., Zipursky, S.L., and Clemens, J.C.** (2004). Alternative splicing of Drosophila Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* 118, 619-633
- Yamakawa, K., Huot, Y.K., Haendelt, M.A., Hubert, R., Chen, X.N., Lyons, G.E., and Korenberg, J.R.** (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Human molecular genetics* 7, 227-237
- Yamauchi, Y., Abe, K., Mantani, A., Hitoshi, Y., Suzuki, M., Osuzu, F., Kuratani, S., and Yamamura, K.** (1999). A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Developmental biology* 212, 191-203
- Yasuda, K., Momose, T., and Takahashi, Y.** (2000). Applications of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Development, growth & differentiation* 42, 203-206
- Yu, W.M., Chen, Z.L., North, A.J., and Strickland, S.** (2009). Laminin is required for Schwann cell morphogenesis. *Journal of cell science* 122, 929-936
- Zhu, H., Hummel, T., Clemens, J.C., Berdnik, D., Zipursky, S.L., and Luo, L.** (2006). Dendritic patterning by Dscam and synaptic partner matching in the Drosophila antennal lobe. *Nature neuroscience* 9, 349-355
- Zipursky, S.L., Wojtowicz, W.M., and Hattori, D.** (2006). Got diversity? Wiring the fly brain with Dscam. *Trends in biochemical sciences* 31, 581-588