Osaka University Knowledge Archive

Title	アフリカツメガエル胚の頭部感覚器官形成における Xhairy2の機能解析 : 特にレンズ形成におけるその必要性について
Author(s)	村戸, 康人
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1506
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

アフリカツメガエル胚の頭部感覚器官形成における *Xhairy2* の機能解析：特にレンズ形成におけるその必要性について

Functional analyses of *Xhairy2* in the formation of cranial sensory organs in *Xenopus laevis* embryos: Requirements for lens formation

村戸 康人

大阪大学大学院　理学研究科
生物科学専攻　生命誌学研究室

２００９年２月２日

目次

１．要旨 p. 3

１－１　和文要旨

１－２　英文要旨

２．序論 pp. 5-11

２－１　脊椎動物の頭部の構成：特にプラコードについて

２－２　脊椎動物におけるレンズ形成

２－３　レンズ形成に関わる遺伝子群

２－４　*Hes* 遺伝子とレンズ形成

２－５　本研究の目的と概要

３．材料と方法 pp. 12-31

３－１　アフリカツメガエル胚の準備と調整

３－２　微注入と胚の固定，移植

３－３　アンチセンスモルフォリノオリゴ

３－４　プラスミド作成

３－５　*in vitro* RNA プローブ合成

３－６　*in vitro* mRNA 合成

３－７　RT-PCR

３－８　ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

(Whole-mount *in situ* hybridization, WISH)

３－９　リン酸化ヒストン H3 染色 (Phospho-histone H3 staining, PHH3)

３－１０　Hydroxyurea/ Aphidicolin (HUA)処理

３－１１　ホールマウント TUNEL

３－１２　パラフィン包埋と切片作成

３－１３　BrdU ラベリングと検出

３－１４　免疫組織化学

３－１５　レポーター検定

３－１６　ウェスタンブロッティング

４．結果 pp. 32-39

４－１　*Xhairy2* の発現パターン

４－２　*Xhairy2* の機能阻害は球状レンズ構造の消失を引き起こす

４－３　*Xhairy2* の機能阻害により PLE や LP でのマーカー遺伝子の発現が減少するが網

膜マーカー遺伝子の発現には変化がない
４－４　神経胚において *Xhairy2* は LF の形成に必要とされるが PPE マーカー遺伝子の発現には必要ではない
４－５　*Xhairy2* 機能阻害は PPE マーカー遺伝子の制御に選択性を示す
４－６　LF における *pax6* の発現消失は細胞周期阻害因子 $p27^{xic1}$ の異所発現により部分的に引き起こされる
４－７　*Xhairy2* 機能阻害は後期神経胚における LF 内の細胞増殖に影響を与えるが，細胞周期の阻害自体が LF 消失やレンズ形成不全を引き起こしているわけではない

５．考察 pp. 40-47
５－１　本研究で得られた知見のまとめ
５－２　*Xhairy2* の機能阻害でレンズ性細胞の完全な消失が起こらないのはなぜか：*Xhairy2* と *foxE3*, *L-maf* の関連について
５－３　*Xhairy2* による頭部感覚器官プラコード形成の制御
５－４　*Xhairy2* の機能と PPE の性質の関係：Xhairy2 が存在することで PPE はどういった状態にあるのか
５－５　総合議論

６．引用文献 pp. 48-54

７．謝辞 p. 55

８．図と図の解説 pp. 56-57

９．発表論文一覧 p. 58

１．要旨

１－１　和文要旨

脊椎動物の頭部は多種多様な組織・器官から構成される極めて複雑な構造体である．このうち感覚器官や神経節がプラコードと呼ばれる特殊な細胞集団から形成される．多数の細胞種に分化することと，脊椎動物でしか確認されていないという事実から，プラコードは個体発生，系統発生の両方の観点から興味深い存在である．全てのプラコードは，予定表皮領域と予定神経領域の境界にあたる pre-placodal ectoderm (PPE)に由来すると考えられているが，アフリカツメガエル *Xhairy2* 遺伝子は，知られている限り，PPE で最も早くから明瞭な発現を示す．本研究は，プラコードから生じる頭部感覚器官の形成を指標として *Xhairy2* がプラコードの生成に果たす役割を明らかにすることを目的とした．*Xhairy2* 機能阻害胚の頭部を形態学的に解析したところ，網膜は形態的に正常ながら，球状レンズの顕著な形成不全が起こることが明らかになった．脊椎動物の眼はその構成要素を大きく網膜とレンズに大別できるが，網膜は脳の一部から，レンズはプラコードから形成される．眼の発生の各段階でマーカー遺伝子の発現変化を詳細に確認したが，*Xhairy2* 機能阻害は一貫してレンズ系譜の遺伝子発現を減少させた．これらの結果は *Xhairy2* がレンズ形成に特異的に必要とされることを示している．このメカニズムとして，*Xhairy2* 機能阻害による $p27^{xic1}$ の異所発現の関与が認められた．まず，$p27^{xic1}$ の異所発現を示すアポトーシスの誘導が，*Xhairy2* 機能阻害胚で見いだされた．さらに，$p27^{xic1}$ の過剰発現は *Xhairy2* 機能阻害とよく似た表現型を示し，*Xhairy2* 機能阻害の表現型は，同時 $p27^{xic1}$ を機能阻害することで部分的に緩和された． $p27^{xic1}$ は第一義的に細胞周期阻害因子であるので，*Xhairy2* 機能阻害によって，レンズ系譜の前駆細胞の数が激減していることが予想された．BrdU の取り込みを指標として，レンズ誘導が起こる領域での増殖能の変化を確認したところ，*Xhairy2* 機能阻害胚において少なくともレンズ誘導が起こる時点での増殖能には顕著な変化は見られなかった．細胞周期を直接阻害する薬剤で一定期間処理した胚においても，レンズ誘導は正常に起こっていた．これらの結果から，*Xhairy2* は $p27^{xic1}$ のもう一つの活性である分化誘導能を抑制していることが示唆された．プラコードがその運命が最初に指定されてから実際に分化が開始されるまで，かなりのタイムラグがある．この期間，如何にして組織幹細胞様の未分化性を維持できるかが，極めて重要である．レンズ形成を指標にしたとき，*Xhairy2* が転写因子カスケードの最上流に位置するわけではなく，尚かつ $p27^{xic1}$ の発現抑制を介して分化抑制に関与していることから，*Xhairy2* が PPE で先行して発現することで，未分化性が積極的に維持されているのではないかと考えられる．シグナル入力から始まる分化のカスケードは，この基本的な細胞の状態，コンピタンスが存在して初めて，正常に機能するのではないだろうか．

１－２　英文要旨

Vertebrate head is a complex structure that consists of various kinds of tissues and organs. Among them, cranial sensory organs and ganglions are derived from special cell groups, called placodes. Based on the facts that they differentiated into multiple cell types and that are only found in vertebrate lineages, placodes are interesting subjects of studies from the perspectives of both ontogeny and phylogeny. Lines of studies have suggested that all placodes are derived from the pre-placodal ectoderm (PPE) that is boundary between future epidermis region and future neural region. A *Xenopus* gene *Xhairy2* is, to our knowledge, the earliest gene that shows clear expression in PPE. The present study aimed at elucidating a function(s) of *Xhairy2* in the formation of placodes by examining formation of cranial sensory organs. Morphological analyses of *Xhairy2* morphants revealed that ocular lens was severely malformed though retinal structure looked normal. Vertebrate eyes are divided into retina and lens in terms of their origins: retina is formed from a part of diencephalons, while lens is developed from placode. Detailed marker gene analyses of eye in *Xhairy2* morphants showed that the expression of all lens marker genes tested was reduced or abolished, while that of retinal marker genes was not affected. These results indicated that *Xhairy2* was specifically required for lens development. Ectopic expression of $p27^{xic1}$ by means of *Xhairy2* knockdown was identified as a first trigger of lens malformation. First, apoptosis was induced in *Xhairy2* morphants, which is a known marker of ectopic expression of $p27^{xic1}$. Second, overexpression of $p27^{xic1}$ mimicked phenotypes of *Xhairy2* morphants. Finally, the phenotypes of *Xhairy2* knockdown were partially rescued by simultaneous knockdown of $p27^{xic1}$. Since $p27^{xic1}$ is a cell-cycle inhibitor, it was assumed that the number of lens precursor cells was drastically reduced. To test this assumption, cell proliferation within regions of lens induction was examined by means of BrdU incorporation analyses in *Xhairy2* morphants. However, no significant changes were observed at the onset of lens induction. Furthermore, lens induction occurred normally in the embryos treated with drugs that directly inhibit cell cycle. Collectively, the results suggested that *Xhairy2* repressed the differentiation inducing activity, another activity of $p27^{xic1}$. Placodes start differentiation long after the first fate decision. Therefore, it is quite important how they maintain stem-cell-like undifferentiated states. As *Xhairy2* did not seem to be a master regulator of cascade of lens transcription factors and was shown to be involved in inhibition of differentiation via repression of $p27^{xic1}$ expression, it was suggested that the undifferentiated states was actively maintained by early PPE expression of *Xhairy2*. The cascade of differentiation beginning with a signal input would normally work only when this kind of fundamental cell state, competence, exists.

２．序論

２－１　脊椎動物の頭部の構成：特にプラコードについて

脊椎動物の頭部は，脳を除いて，そのほとんど全ての構造が，神経堤とプラコードの細胞群から形成される（図１，Schlosser 2008）．神経堤は，神経管背側を形成する領域であり，プラコードは，頭部外胚葉領域の一部に見られる肥厚した（細胞が柱状を示す）領域を指す（図２ B）．プラコードからは主に感覚細胞，神経細胞，分泌細胞が形成されこれにより頭部感覚器官（嗅覚，視覚，聴覚）が形作られる．神経堤からも神経節を形成する神経細胞が生じるが，頭部構造それ自体とも言える骨，筋肉なども形成され，より幅広い分化能を有する．さて，神経胚胚におけるプラコードと神経堤の予定領域は，どちらも中枢神経系原基である神経板の前方，側方を囲む予定表皮領域にあたる（図２ A）．これは，色素による標識を用いた追跡実験から明らかにされたもので，特に神経胚期から運命が決まっていることを指すものではなかった．

しかし，A. Jacobson による両生類胚を用いた予定プラコード領域の回転実験から，頭部感覚器官の運命決定は，中期神経胚あたりに決定されていることが明らかになった（Streit 2004）．これを裏付けるように，中期神経胚期には，各感覚器官プラコードの予定領域を標識する遺伝子発現が確認できる（図４ A，Schlosser and Ahrens 2004）．こういった初期の特異的な遺伝子発現の同定が，一時下火になっていたプラコード形成に関する研究を再び活性化した．その最も大きな理由と成ったのが，レンズプラコード以外の全ての頭部プラコードで発現をみせる *six1* 遺伝子の単離であった（ツメガエルでは，Pandur and Moody 2000）．*Six1* のノックアウトマウスでは，様々なプラコード由来の組織に形成不全が起こることが報告されている（Zou et al. 2004）．*six1* は，ツメガエルで中期神経胚あたりから発現を開始し，しかも，確かに前方部神経板を囲むように発現している（図４ B）．他にも，レンズプラコードを除く頭部感覚器官プラコード全てで発現が見られる *dlx5*（例えば Schlosser and Ahrens 2004）も，後期原腸胚あたりから神経板の前方部を囲む領域で発現が開始される．こういった，全プラコード遺伝子 pan-placodal gene の存在が，全てのプラコードが共通の性質を持って共通のメカニズムで誘導されているのではないか，という仮説を生み出している（例えば Streit 2004）．ただし，なぜこういった遺伝子がレンズプラコードで発現しないのかについては，依然として納得のいく説明がなされていない．レンズプラコードが，「他人のそら似」である可能性は現在否定できない状態である．

２－２　脊椎動物におけるレンズ形成

脊椎動物の眼は，網膜を形成する神経外胚葉と，レンズを形成する非神経（表皮）外胚葉の，二つの素材から形成される．これら二つの組織は，発生の過程で相互に独立したものではない；むしろ，両者は強い相互依存の関係にある（図５を参照）．非神経外胚葉におけるレンズ誘導は，発達中の神経網膜（眼胞 OV）が突出してそれに覆い被さる非神経外胚葉（予定

レンズ外胚葉 PLE) に接したときに起こるとされている．誘導を受けた外胚葉は肥厚を開始し，レンズプラコード (LP) を形成し，これがさらに発達してくびれ切れてレンズ胞 (LV) へと変化し，これがさらに成熟していくことで最終的に球状レンズが形成される．レンズ系譜の発生と足並みを合わせるように，OV は眼杯 (OC) を形成し，これが成熟して，神経節層，細胞体層，光受容体細胞層という大きく分けて三種の特徴的な層からなる網膜を形成する（図１３）．

古典的な実験発生学の最初の知見は，OV 原基を加熱針で損傷させたとき，網膜のみならずレンズが形成されない，ということで，これをもとに，レンズ誘導にはシグナル源として OV が必要であるということが示された (Spemann 1901 [Hamburger 1988 から引用])．これは，後に，より洗練された実験がなされている．尾芽胚期に毛髪のループを用いて眼胞を切除するというもので，この時もレンズは形成されなかった（図６ A 参照；Hamburger 1988)．しかし，これ以降，アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を含む様々な脊椎動物種を用いた追試がなされ，結果として浮かび上がってきたことは，レンズ誘導に OV は必ずしも必要とされないということだった．これらの実験では常に OV を直接切除していたわけではなく，図６ B に示したように，神経板期に網膜原基の領域（前方部神経板の一部）を切除するという実験操作が多くなされている．実際，OV 非存在下でレンズが誘導される例は多く見受けられる（図７，例えば，Henry and Grainger 1987; Mizuno et al. 1998，或は以下の文献で概説されている：Tahara 1962; Jacobson and Sater 1988)．ただし，こういった事例では，精密なパターンを有する球状レンズ構造というより，自由レンズ (free lens) もしくはレンズ様構造 (lentoid) が頻繁に見いだされていた．これは，網膜もしくは発達中の網膜原基が発揮する造形効果 (formative effects) の存在を暗示するものであり，具体的には，発達中レンズの形態，大きさ，維持，分化の制御を挙げることができる (Holtfreter and Hamburger 1955 [Hamburger 1988]から引用])．例えば，イモリ胚では，OV 非存在から得られた自由レンズはレンズ上皮のみから構成され，最終分化したレンズ繊維はほとんど観察されていない (Mizuno et al. 1998)．これらの知見は，以下のようにまとめることができる．多くの側面で，レンズ形成は網膜ないし発達中の網膜原基（神経板期を含む）を絶対的に必要としているが，ことレンズ誘導という現象に限って言えば，上記にみられる知見の食い違いは（少なくとも幾つかの脊椎動物種では）誘導シグナルが発生する時期の違いによる，というものである (Grainger 1996)．つまり，OV 形成以前の神経板期の場合もあるし，OV が形成される尾芽胚期の場合もあるということである．分子マーカーを用いた近年の研究のいくつかは，この考えを支持している．例えば，ゼブラフィッシュ変異体 *chokh* では，OV が突出せず表皮外胚葉に接触しないにもかかわらず，レンズが形成される (Loosli et al. 2003)．また，ニワトリ胚では，前方部神経板を囲む予定表皮外胚葉は *pax6* を発現し，それを原腸胚期に切除しそれを単離培養すると自律的に一連のレンズ系譜マーカー遺伝子を発現し，最終的には δ-crystallin 陽性のレンズ様構造へと分化することが見いだされた (Bailey et al. 2006)．

この事実に基づき，PPE 全体がデフォルトとしてレンズ運命を持っているという提案がなされた (Bailey et al. 2006)．哺乳類胚では，原腸胚，神経胚でレンズ誘導が起こるという報告もないし（対応する遺伝子発現が未だに見つかっていない)，外胚葉の一部がデフォルトでレンズの性質を持っているという報告もない．おそらく，レンズ誘導機構に関する種間の表面的な差は，典型的な異時性 Heterochrony (Richardson 1995; Richardson 1999 が参考になる）の例であると思われる．異時性とは，進化の過程において発生現象のタイミングや期間が変化することを指す．メカニズムは，全体として種間で似ていると言えるが，多少の差は（発現する遺伝子の差や，ある特定の遺伝子がもつ重要性の差など）進化的に許容された異時性の類いであると考えられ，こういった差にだけに注目して高等／下等，祖先的／派生的というような議論を行うのは本末転倒であろう．

レンズ誘導についての近年の理解は，それが一段階では起こらないというものである．ツメガエル胚を用いた一連の組織移植研究で，R. M. Grainger と同僚らは，レンズ誘導に関する段階的決定モデルを構築した (Grainger 1992)．レンズ誘導の過程は，実験的な定義により，コンピテンス，バイアス，決定（特異化)，分化の段階から成るというものである（図８）．ツメガエル胚では，後期神経胚期に前方部神経板（網膜原基）を切除しても自由レンズが形成されるが，初期神経胚期における同様の操作は，レンズ不形成という結果に終わる (Henry and Grainger 1990)．これらの結果は，中期神経胚期 (st.15/16) あたりで，前方部神経板に隣接する非神経外胚葉はレンズ誘導シグナルを受け取り，レンズ形成運命に対してバイアスがかかっていることを示している．また，別の組織移植実験では，神経胚において，本来レンズが形成されるべき領域（レンズ場 LF）に様々な領域の外胚葉を交換移植したとき，レンズが形成されない場合が多くあることが示された (Henry and Grainger 1987; Servetnick and Grainger 1991)．これは，どのような外胚葉でもレンズ誘導シグナルを受容しレンズを形成できるわけではなく，むしろ適切な性質（コンピテンス）が必要であることを示している (Henry and Grainger 1987)．合わせて考えると，ツメガエルにおいては，レンズコンピテンスとレンズバイアスの獲得が，以降のレンズ形成の進行に重要であると言える．

２－３　レンズ形成に関わる遺伝子群

レンズ系譜で活性化される遺伝子がこれまで同定されており，この積み重ねの結果，分化マーカーである *crystallin* 遺伝子の発現につながる分子カスケードに到達している (Ogino and Yasuda 2000; Kondoh 2008)．特にマウスやヒトといった哺乳類において，この種の知見が集積され随時更新される遺伝子カスケードが構築されている．狭義のレンズ誘導物質に関してもノックアウトマウスによる解析結果を元に議論されているのが現状である．ツメガエル胚での知見を紹介する前に，マウスで得られた知見を概観する．マウス，ツメガエル間で異なる遺伝子がレンズ形成に働いていることは当然想定されることだが，それでも根幹部分のシステムは共通であることが知られているため，誤解につながることはないと判断した．

最も重要な遺伝子は他でもなく *pax6* であり，これはショウジョウバエの変異体 *eyeless, twin of eyeless* のホモログである．眼のタイプによらず，その形成に極めて重要な役割を持っていることが様々な動物で示されている (Lang 2004 が参考になる)．マウスでは，*Pax6* は最初網膜系譜にて発現が開始されるが，PLE の段階からレンズ系譜でも発現を開始し，LP でより強い発現を見せる．*Pax6* はマウス *small eye* (*sey*) 変異体の原因遺伝子で，同様の変異を持つラットにおける組織移植実験の結果から，*Pax6* はレンズ形成において細胞自律的に必要とされることが明らかになった (Fujiwara et al. 1994)．ヒトにおいても，レンズ形成不全を生じる遺伝病 *Aniridia* の原因遺伝子として *PAX6* が同定されている．このケースでは，レンズ系譜発現特異的で脊椎動物を通じて保存されているエンハンサー *SIMO* に変異が見られる (Kleinjan et al. 2001)．*Pax6* の下流で働く遺伝子は多数存在するが，極めて重要とされるものを一つ挙げれば，*FoxE3/FOXE3* である．マウスでは，*FoxE3* は E8.75 の PLE で発現を開始し，*Pax6* と異なり網膜系譜では発現が見られない (Brownell et al. 2000)．ノックアウトマウスの解析から，*FoxE3* はレンズ前駆細胞の増殖・分化の制御両方に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Medina-Martinez et al. 2005)．レンズ胞の閉塞・分離やレンズ上皮での細胞増殖低下が引き起こされるマウス変異体 *dysgenetic lens* (*dyl*) の原因遺伝子である (Brownell et al. 2000)．また，ヒトの眼の先天性奇形 Peter's anomaly は，*PAX6* の変異が高頻度で見いだされるが，*FOXE3* の非同義置換も報告されている (Ormestad et al. 2002)．

Pax6 の PLE での発現と LP での発現は，それぞれ異なるエンハンサーにより引き起こされている．このうち，PLE の *Pax6* がどのように発現誘導されるかは不明であるが，PLE の Pax6 が LP の *Pax6* 発現に必要であるということは判明している (Grindley et al. 1995)．狭義のレンズ誘導の指標が LP の形成であるため，LP の *Pax6* の発現を誘導する因子がいくつか同定されており，現代的な意味でのいわゆる「誘導源」であるかもしれないと想像されている．最初に発見されたのが，*Bmp7* である．*Bmp7* は，PLE，予定網膜色素上皮，背側 OV で発現しており (Dudley and Robertson 1997)，*Bmp7* のノックアウトは，眼の形成に異常を引き起こすが，レンズ系譜で注目すべきは LP が形成されないという異常と LP の *Pax6* 発現が消失するという異常である (Wawersik et al. 1999)．ただし，この異常の原因として，PLE の Bmp7 が自律的に必要なのか，それとも網膜系譜の Bmp7 が誘導因子としてレンズ系譜に必要なのかは不明である．この意味では，より誘導因子らしい振る舞いを見せるのが *Bmp4* である．*Bmp4* も，レンズ系譜，網膜系譜の両方で発現が見られるが，*Bmp4* ノックアウトマウスの PLE と野生型 OV を接合して培養するとレンズが形成されることから，PLE の Bmp4 はレンズ誘導に必要なく，OV の Bmp4 が誘導因子として必要とされることが示唆されている (Furuta and Hogan 1998)．ただし，*Bmp4* ノックアウトでは *Pax6* の発現に変化は見られない．代わりに，Pax6 と協調して *Crystallin* のプロモーターに結合して転写を活性化させることが知られる *Sox2* の発現が消失する (Furuta and Hogan 1998)．*Bmp* について合わせて考えると，*Bmp7* は LP の

*Pax6*を誘導し，*Bmp4*はLPの*Sox2*を誘導し，結果としてLPがPax6とSox2で二重陽性になり，*Crystallin*の発現が誘導されるというモデルを考えることができる．

もう一つ重要と考えられているのが，FGFシグナル経路に関わる遺伝子である．FgfRのリン酸化酵素活性を薬剤で阻害したり，FgfR1のdominant negative変異体をPLEで発現させると，LPの形成などに異常が見られる（Faber et al. 2001）．Dominant negativeのFgfR1をレンズプラコードで発現するホモのトランスジェニックマウス*Tfr7/ Tfr7*とBmp7-/-を掛け合わせたマウスを用いた解析で,FGF受容体経由のシグナルがLVの分離やLPにおける*Pax6*の発現に必要とされることが明らかになった（Faber et al. 2001）．しかし，肝心のリガンド（FGF）ついては，候補はあるものの同定はなされていない．これはFGFの種類が多いこと，発現領域が胚の様々な領域で見られること，一部のFGFは極めて早い時期から発現しておりノックアウトが胚性致死を引き起こすことなどによるのだろう．しかし，Bmp，FGFに限らず，分泌因子がOVからの誘導源として提示されるたびに，「なぜPLEだけが反応するのか，頭部の外胚葉が広く反応してレンズ誘導を受けるのではないのか」という反駁が多く見受けられる．これに対しては，OVが近接するにつれてPLEとOVの間の限局した空間での分泌因子濃度が上昇し，これがある閾値を超えたところでPLEだけが反応するのだという反論がなされるが，ドングリの背比べである．別のアプローチからの証明が必要とされるだろう．この意味で近年注目を浴びているのが，組織間の物理的接触によりシグナルが伝わる仕組みである．自然とNotchシグナルに白羽の矢が立てられたものの，機能解析のデータが提出されたのはごく最近で，しかもそれはマウスではなくツメガエルの系であった．Oginoらは，*foxE3*のエンハンサー解析からNotchシグナルの関与を明確に示し，OVで特異的に発現するリガンドDelta2の機能阻害でPLEの*foxE3*の発現が消失することを示した（Ogino et al. 2008）．また，受容体として，*notch2*がPLEを含む頭部外胚葉で広く発現していることを見いだしている（Ogino et al. 2008）．マウスでも，Notchシグナル構成因子のノックアウトマウスが作成されているが（Rowan et al. 2008），レンズ形成の後期（LV以降）に数あるシグナル経路の一つとしてNotchシグナルが必要ということ以上までは明らかになっておらず，哺乳類でもレンズ誘導に関わるかどうかは現在不明である．まとめると，H. Spemannが提出したレンズ誘導の古典的モデルにおける狭義の誘導物質として，遺伝子レベルでの解析の結果様々な側面で理にかなった性質を有するのはツメガエルのDelta2であるということになる．今後，更に知見が蓄積されていくだろう．

ツメガエルでは，神経板期に，*otx2, six3, pax6*が前プラコード外胚葉（PPEもしくは前プラコード領域PPRとも表記されることがある）内で限局した発現を見せることが知られている．PPEは，前方部神経板を囲む非神経外胚葉で，この領域から頭部プラコードが形成されることが知られている（Schlosser and Ahrens 2004; Streit 2004が参考になる）．これらの遺伝子のPPE内における発現は，LFを標識し，レンズバイアスのかかった状態であると考えられている（Zygar et al. 1998）．*foxE3*（*lens1*として同定された）は，レンズ系譜に

限局した発現を見せる遺伝子で，その発現は神経胚期から開始される (Kenyon et al. 1999). *foxE3* の神経胚における発現もまた，レンズバイアスのかかった状態を表していると考えることが出来る．これらの知見を合わせると，レンズ形成の初期段階を理解する一つの方法は，LF マーカー遺伝子の発現制御にかかわる因子を同定することであると考えられる．本研究では，そういった可能性のある候補として，ツメガエル *hairy and enhancer-of-split (Hes)* 遺伝子である *Xhairy2* を同定した．

２－４　*Hes* 遺伝子とレンズ形成

Hes ファミリー遺伝子は，塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写抑制因子をコードしており，動物界で様々な発生過程にかかわっていることが知られている (Fisher and Caudy 1998; Davis and Turner 2001). 脊椎動物の発生においては，*Hes* による神経発生の制御が特によく研究されており，一連の証拠から *Hes* は分化の阻止と細胞増殖の促進に関わっていることが明らかにされている (Kageyama et al. 2008). しかも，Hes1 が，最終分化と恒久的な細胞周期停止から静止細胞を積極的に保護する役割を持っていることが最近報告されており (Sang et al. 2008)，特に幹細胞様の多能性細胞における重要性を垣間みることが出来る．さて，マウスの *Hes1* は，眼の発生に関与していることが知られている．ノックアウトの研究では，Hes1 が網膜ニューロンの分化を制御し (Tomita et al. 1996; Lee et al. 2005)，*Pax6* と協調して OV の形成と突出を制御していることが示された (Lee et al. 2005). これらの事例では，レンズ形態形成もまた阻害されており，これは主に発達中の網膜の正常な機能が失われていることによるのではないかと考察されている (Tomita et al. 1996). また，全てではないにしても，多くのケースで *Hes* 発現の上流シグナルである Notch シグナルのについても，レンズにおける必要性が示唆されている．最近，Notch シグナルエフェクターである *Rbpj* の PLE 特異的ノックアウトマウスが報告され，LV における Hes1 分布の乱れがあるという結果が得られている．Hes1 を介しているかは不明だが，Notch シグナルは，前方部レンズ上皮における一次レンズ繊維細胞の分化のタイミングを制御していることが示された (Rowan et al. 2008).

２－５　本研究の目的と概要

Xhairy2 は，哺乳類 Hes 因子の中で，*hes1* に塩基配列が最も似ており，底板や神経堤といった外胚葉性組織や，前方部脊索前板や体節といった中胚葉性組織で発現が見られる (Tsuji et al. 2003). *Xhairy2* は，組織性質の維持や，未分化状態ならびに増殖可能な状態の維持に働いていることが示されていた (Yamaguti et al. 2005; Nagatomo and Hashimoto 2007). *Xhairy2* は原腸胚期から PPE にあたる領域で発現している．この発現は，FGF シグナルと BMP シグナルに制御され，Notch シグナルには制御されないことが知られている (Yamaguti et al. 2005; Nagatomo and Hashimoto 2007; Nichane et al. 2008). しかし，*Xhairy2* が頭部感覚

器官の形成に関与するのかどうかは不明であった．

本研究では，*Xhairy2*がLF形成の段階から，レンズの発生に必要とされることが明らかになった．*Xhairy2*はLFを含むPPEにおいて，原腸胚期から発現している．モルフォリノアンチセンスオリゴ（MO）の微注入により，*Xhairy2*の機能阻害が，レンズ形成の各ステップでレンズ系譜マーカー遺伝子の発現の減少を引き起こし，結果として，球状レンズ構造の形成不全を生じた．興味深いことに，網膜の形態と網膜前駆細胞のマーカー遺伝子の発現には顕著な変化が見られなかった．しかし，*Xhairy2*の過剰発現によってLFの拡大は起こらず，これは*Xhairy2*がレンズ形成に特異的な既存の転写因子カスケードの外側で機能していることを示唆している．また，*Xhairy2*の機能阻害では，LF誘導に必要とされる既知のシグナル経路の構成因子の発現に影響が見られなかった．代わりに，*Xhairy2*機能阻害によるLF消失は，細胞周期阻害因子をコードする*p27*^{xic1}の同時機能阻害により，部分的に緩和された．しかし，細胞周期を阻害する薬剤の処理の結果は，細胞数の減少それ自体がLF消失を引き起こすわけではないことを示唆した．これらの結果に基づいて，*Xhairy2*はレンズ発生のプログラムが動くための細胞内環境を整える役割を持っていることを提唱したい．

３．材料と方法

３－１　アフリカツメガエル胚の準備と調整

産卵させる１週間前に，プレプライミングを行う：20 IU（100 IU x. 0.2 ml）のゴナドトロピン（Calbiochem #367222, Gonadotropin, Pregnant Mare Serum）をメスのアフリカツメガエルに皮下注射し，二次卵母細胞への成熟を促す．液量が少なく，注射の際に空いた穴からゴナドトロピンが漏れ出る可能性があるので，注射針は 25G を用いて針を奥まで差し込む．産卵させる前日，プライミングを行う：700 IU のゴナドトロピン（SIGMA CG-10VL, Chorionic Gonadotropin, human）をプレプライミング済みのカエルに皮下注射し，1L の 1x. HS-Barth（110 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM $NaHCO_3$, 0.82 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.41 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM HEPES, pH 7.4）が入ったタッパーに移して 17°C で放置する．卵が水につかるとゼリー層が膨潤して受精しなくなるので，必ず 1x. HS-Barth 内で産卵させる．注射針は 25G でも 26G でも結果に大差ない．反応は時としてばらつくが，概ね 14-16 時間で産卵を開始する．強いストレスを与えると産卵を阻害してしまう恐れがあるので，プライミングは手早く短時間で済ませるように心がけた．また，ゴナドトロピンはオートクレーブ処理した 0.6% NaCl 溶液に溶かした．

人工受精に用いる精巣を得るため，受精する当日に健康なオスを 1L の 4% MS222（Ethyl 3-aminobenzonate methanesulfonate salt, SIGMA A5040-250G）溶液に入れて麻酔し，開腹して精巣を全摘する．回収した精巣は，フタ付きのガラスシャーレに移し，氷上で保存する．基本的に，当日限りで使用する．

人工受精の際は，ガラスシャーレに卵を集め，1x. HS-Barth を出来る限り除去する．ガラスシャーレ一枚あたり 200　l の人工精液を準備する．1.5 ml チューブに，適量の 1x. HS-Barth と新鮮な精巣を４分の１〜５分の１程度切り取って入れ，ホモゲナイズする．これを卵にかけ，プラスチック製の棒でよく撹拌し，５分間静置する．卵が半分浸るほどの少量の RO 水を加え，さらに１５分間静置する．最後に，卵が完全に浸かるように RO 水を加え，45 分間静置する．この間に表層回転が起こるため，絶対に動かしてはいけない．精液を加えてから１時間経過した後，ほぼ全ての卵が動物極を真上にしていれば受精した証拠である．さらに詳しく観察すると，受精した卵の動物極付近にはごく小さな気泡があることに気付くであろう．受精した卵の割合が低いように見える時は，受精したように見える卵に関してこの気泡の有無を確かめると，偶然に動物極を真上にした未受精卵なのか，それとも運良く受精した卵なのか，容易に見分けることが出来る．この人工受精の方法では，基本的に限りなく 100%に近い割合で受精が起こる．よって，受精の割合がだいたい７割を下回っている場合は，卵もしくは精子（或は両方）に何らかの問題があると考えてよい．卵の問題（古い，もしくは，未成熟）はその回（もしくはそのメス）では解決できないが，精子に問題がある場合は，人工精液に用いる精巣の量を増やすか，精巣を新たに得ることで解決できる．それでも解決できない場合は，1x. HS-Barth に問題があると考えるべきである．特に，ストック溶液を新規に作成した直後は，真っ先にこの問題を疑った方が良い（もしそうなら，速やかに

廃棄処分し，新たに作成する)．最低限の事前策として，1) 新規作成分について問題がないことを確認できるまで前回作成分を少量保存しておく，2) 新規作成分について，前回作成分と溶液の濃さ・pH が同等であることを確認する，の二つを確実に実行すべきである．

卵を包むゼリー層はいかなる実験操作も受け付けないため，3% Cystein Hydrochloride (SIGMA C-1276 250G)，pH 7.5 溶液を用いて除去する．ガラスシャーレ中の水を捨て，約 50 ml のシステイン溶液を加える．ホモゲナイズ棒で十分に撹拌し，10 分間反応させる．数分に一度，様子を見ながら穏やかに撹拌する．あまりに頻繁に撹拌すると，卵膜を損傷させ正常発生に支障を来してしまうので，程々にすべきである．穏やかにスイングするシーソーを用いても差し支えない．反応終了後，RO 水で 2-3 回洗浄し，最後に 0.1 x. Barth (1x. Barth: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM $NaHCO_3$, 0.82 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.41 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM HEPES, pH 7.4) を加えて培養する．

胚のステージングは，Nieuwkoop と Faber による発生段階表に従った (Nieuwkoop and Faber 1967)．発生の進行に影響を与える要因は，温度 (15℃-25℃) と容器 (ガラスシャーレもしくは 0.1 x. Barth, 1.2% agarose プレート) である．温度が高ければ発生が早く進むことは容易に想像できるが，不明な理由で，agarose プレートで培養した場合はガラスシャーレで培養したときよりも発生が若干早く (最大で２時間程度) 進むことに留意すべきである．ガラスシャーレを用いて 16°C で培養する場合，時間の目安は，受精後 24 時間で初期原腸胚 (st. 10)，48 時間で後期原腸胚 (st. 12.5)，96 時間で後期神経胚 (st. 20) である．後期原腸胚から後期神経胚にかけて，受精翌日の日中に固定したい場合は，agarose プレートを用いて 20°C で培養する．目安は，受精後 24 時間で後期原腸胚 (st. 12-12.5)，28 時間で初期神経胚 (st. 13)，30 時間で中期神経胚 (st.14-15)，33 時間で後期神経胚 (st. 19) である．日によって多少変動するので，適宜確認しながら培養する．初期神経胚以降は，大きな形態形成運動が起こらないため場合によっては培養温度を変更しても差し支えないが，原腸形成期に培養温度を変更すると高い割合で形態形成に異常を生じるため (卵黄栓が露出したまま原口が閉じない)，極力避けるべきである．

３－２　微注入と胚の固定，移植

微注入において，安定的に良い結果を得るためには，状態の良い胚の選定と高品質なガラス針の作成が必要不可欠である．φ1.2 mm (内径 0.6 mm) のガラス微細管 (NARISHIGE GC-1.2) をプラー (NARISHIGE PN-30) で加熱牽引する．先端を研磨したピンセットを用いて，牽引したガラス管の先を切り，ガラス針とした．先端の形状を実体顕微鏡で確認し，注射針の先端と同じような形状になっているものだけを使用した．さらに，実際に液を排出して，1 秒間に 4 nl 排出できるようにインジェクター (HARVARD APPARATUS PLI-100) のガス圧を調節するが，基準値よりガス圧を下げる必要がある (つまり，針の径が太い) ものは廃棄した．先端の形状が針と呼ぶにふさわしくないものは論外だが，径が大きいものもまた胚の損傷が大

きくなるため，不適である．

微注入を行う際は，作製したガラス針をインジェクターに接続し，さらにマイクロマニピュレータ（SINGER INSTRUMENTS Mk1）にセットする．実体顕微鏡（Leica MZ125）下で，針が自由に動くことを確認する．1x. Barth 入りのプレートに胚を移し，微注入を行う．注入物質をトレースするために，毎回 *Venus* と *c-β-gal* の mRNA を割球あたり 400 pg 共注した．共注入微注入後は，再び 0.1x. Barth 入りのプレートに移して，培養する．

固定する段階に達した胚を，蛍光実体顕微鏡（Leica MZFLIII）でブルーライトを当てて Venus の蛍光を観察し，意図したところに注入できている胚だけを選別し，その他の胚は廃棄した．ピンセットを用いて卵膜を丁寧に除去し，肥胚腔ないしはその名残の腔を目がけてピンセットで突くか切るかして穴を開け，MEMFA（100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$, 3.7% Formaldehyde, pH 7.4)が入ったサンプルチューブに移した．トレーサーの c-b-gal を発色させる場合は，MEMFA で 30 分固定したサンプルを，1x. PBS（175 mM NaCl, 7.4 mM Na_2HPO_4・$12H_2O$, 1.9 mM NaH_2PO_4・$2H_2O$, pH 7.4）で 5 分 x. 2 回洗浄し，b-gal 発色液［20 mM $K_3Fe(CN)_6$, 20 mM $K_4Fe(CN)_6$・$3H_2O$, 2 mM $MgCl_2$, 0.01% deoxycholate, 0.02% Nonidet P40, 0.54x. PBS, 2mg/ ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside)］で適宜発色させた．ほとんどの場合，サンプル量が多く作業が煩雑になるため，PBS で洗浄した後のサンプルを 4°C で保存し，全て揃ったところで発色を行った．以降の他の染色結果が分かりづらくなるため，発色が強くならないように心がけた．反応を停止させる時は，サンプルを MEMFA が入ったサンプルチューブに移し，終夜固定した．この時の固定時間が短いと，*in situ* ハイブリダイゼーションでシグナルレベルが落ちることが多いので，十分に後固定する．固定が済んだサンプルを 100%メタノールで置換し，次の実験に用いるまで-30°C のフリーザーで保存した．この時も，メタノールで完全に置換できるように気をつける．脱水置換が十分でない場合，whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションの脱色過程でサンプルが発泡して穴だらけになる確率が非常に高くなる．特に，鉄イオンを多分に含むβ-gal 発色液に浸けたサンプルはそのリスクが高いので，注意が必要である．

胚組織の移植を行う場合は，全て抗生物質添加の 1x. Barth 中で行った（Biowhittaker Penicillin Streptomycin Mixture, Lonza, 17-719R: 1000 倍希釈で使用）．卵膜をピンセットで除去した後，パスツールピペットの先端にまつ毛を瞬間接着剤で固定したものを用いて胚の一部を切除した．移植後は，少なくとも３０分は静置して，移植片周囲の修復を促した．

３－３　アンチセンスモルフォリノオリゴ

アンチセンスモルフォリノオリゴ（以下モルフォリノもしくは MO）は Gene Tools から購入した．モルフォリノの呼称と配列は以下の通りである：

Xhairy2a morpholino (Xhairy2a MO): 5’GCATGTTCAGTTGCTGGTACAGTCA3’,

Xhairy2b morpholino (Xhairy2b MO): 5’CGGATAGGGCTAGTGATGCGGATGT3’,

p27^{Xic1} morpholino (p27 MO): 5' GCAGGGCGATGTGGAAAGCAGCCAT3' ,

Zic1 moprholino (Zic1 MO): 5' AAGTCTTCCAACAATGGGCAGCGAA3' ,

XHes2 morpholino (Hes2 MO): 5' CTGCGAGCGCTACATTGGGAGCCAT3' ,

Standard control moprholino (Co MO): 5'CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'.

Co MO の配列は，ヘモグロビン異常症であるサラセミアにおける赤血球β- グロビン pre-mRNA 中 705 番目の部位のスプライシング異常により生じた配列に由来し，正常細胞では特異的標的部位や生物学的活性を有さない（フナコシ　Gene Tools 製品紹介より引用）．また，本文中で「*Xhairy2* 機能阻害」と表記されている場合は，Xhairy2a MO と Xhairy2b MO を等モル混ぜたものにより両方のコピーを機能阻害していることを指す．これは，*Xhairy2* が発現する多くの組織では，単独の機能阻害は質的には同じもののそれぞれ弱い形質しか示さないためである (Murato et al. 2007)．p27 MO, Zic1 MO, Hes2 MO は特異性など過去に記載されたものを使用している（それぞれ Vernon et al. 2003; Sato et al. 2005; Solter et al. 2006)

モルフォリノは，RNase free水に溶かし，5mMのストック溶液を作成して保存した (Co MO は1mM)．適宜希釈したモルフォリノにトレーサーのmRNA溶液を混ぜたカクテルを調整し，使用直前に65°Cで５分間加熱処理した．微注入した重量は，本文ないし図の解説に記載した．モルフォリノのカクテルは少量ずつ分注して冷凍保存し，一回の実験で剰余がでても再利用せず廃棄した．

３- ４　プラスミド作成

pCS2AT+　pCS2+を Xho1 と SnaB1 で切断し，同様に処理した以下の配列を連結挿入した:
(5' CTCGAGGGCGCGCCGATATCTCTAGACGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGTA3').
これを pCS2AT+とした (Yamaguti et al. 2005)．これにより，polylinker1 に Asc1 と EcoRV が追加され，尚かつ T7 プロモーター配列が完全なものとなった．

pCS2AT-TAR+　pCS2AT+を EcoRV で切断し，以下の配列を連結挿入した：
(5' CCAGCGGTCCGCTGGCGGCCGCCCGGGTTTCCATCGGACCGTTGG3').
これを pCS2AT+-TAR+とした．T-vector を作成する場合は，pCS2AT+-TAR+を Xcm1 で切断し，生じる断片をゲル濾過で除去した (C. Hashimoto, unpublished).

Venus/ pCS2AT+　*Venus/ pCX*（理化学研究所の宮脇先生から頂いた）を以下の EYFP 増幅用プライマー組で PCR 増幅した:
F (5' CCCGAATTCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG3')
R (5' CCCGGCGCGCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC3').
得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した．

FL-Xhairy2a/ pBSKS+ ツメガエル cDNA を鋳型にして，全長の *Xhairy2a* を以下のプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCGAATTCTGAGGTGTAGGATCCAGCCTGACGCACAA3’),

R (5’ CCCGCGGCCGCTTCAATAAAACTCCTGCATGTTCGG3’).

得られた断片を EcoR1 と Not1 で切断し，同様の処理をした *pBSKS+*に連結挿入した.

FL-Xhairy2b/ pBSKS+ Yamaguti et al. 2005)に記載.

Xhairy2a-5’UTR/pCS2AT+ *Xhairy2a/pCS2AT* を Nco1 で切断し，生じた断片を除去した後，自己連結した.

Xhairy2b-5’UTR/pCS2AT+ *Xhairy2b/pCS2AT+*を Pst1 と Asc1 で切断し，生じた断片を除去した後，自己連結した.

Xhairy2a-CDS/ pCS2AT+ *Xhairy2a/pBSKS+*を鋳型にして，*Xhairy2a* のコード領域を PCR 増幅した:

F (5’ CCCATCGATATGCCCGCAGATACCATG3’)

R (5’ GGGCTCGAGTCACCATGGTCTCCACACTG3’).

断片を BamH1 と Xho1 で切断したのち、同様の処理を行った *pCS2AT+*に連結挿入した.

*Xhairy2b-CDS/ pCS2AT+ Xhairy2b/pBSKS+*を鋳型にして，*Xhairy2b* のコード領域を下に示すプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCGAATTCCACCATGCCTGCAGATAGTATGGAGAAG3’)

R (5’ CCCGGCGCGCCTCACCATGGTCGCCACACGGACTC3’).

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し、同様に処理した *pCS2AT+*に連結挿入した.

Xhairy2a/ pCS2AT+ *Xhairy2a* の 5’ UTR とコード領域を下に示すプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCGAATTCTGAGGTGTAGGATCCAGCCTGACGCACAA3’)

R (5’ GGGCTCGAGTCACCATGGTCTCCACACTG3’).

得られた断片を EcoR1 と Xho1 で切断し、同様に処理した *pCS2AT+*に連結挿入した.

Xhairy2b/ pCS2AT+ *Xhairy2b* の 5’ UTR とコード領域を下に示すプライマー組で PCR 増幅した:

F（5’CCCGAATTCCACCATGATCCAGCCAAGCC3’）

R（5’CCCGGCGCGCCTCACCATGGTCGCCACACGGACTC3’）.

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し、同様に処理した *pCS2AT+*に連結挿入した.

Xhairy2a-MT/ pCS2+　*Xhairy2a* の 5’UTR と CDS を以下のプライマー組で PCR 増幅した:

F（5’CCCGGATCCAGCCTGACGCAC3’）

R（5’CCCATCGATGCCATGGTCTCCACACTGACT3’）.

得られた断片を Cla1 と BamH1 で切断し、同様の処理を行った *pCS2+MT* に連結挿入した.

Xhairy2b-MT/ pCS2AT+　*Xhairy2b/ pCS2AT+*を Eco47III で切断し、そこに *pCS2+MT* を Aat1, BanIII で切断し T4 DNA polymerase で末端平滑化した断片を連結挿入した.

-mo Xhairy2a-MT/ pCS2AT+　*Xhairy2a-MT/ pCS2+*を以下のプライマー組で PCR 増幅した：

F（5’CCCATCGATATGCCCGCAGATACCATG3’）

R（5’GCAATTAACCCTCACTAAAGGG3’）

得られた断片を BamH1 と EcoR1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した.

-mo Xhairy2b-MT/ pCS2AT+　*Xhairy2b-MT/ pCS2AT+*を、以下のプライマー組で PCR 増幅した：

F（5’CCCGAATTCCACCATGCCTGCAGATAGTATGGAGAAG3’）

R（5’CCCGGCGCGCCTCACCATGGTCGCCACACGGACTC3’）.

得られた断片を EcoR1, Asc1 で切断した後、同様の消化処理を行った *pCS2AT+*に連結挿入した.

p27^{xic1}/pCS2AT+　以下のようなプライマー組を用いて，ツメガエル cDNA を鋳型に PCR 増幅を行った:

F:（5’CCCCGAATTCCACCATGGCTGCTTTCCACATCGCCCTG3’）

R:（5’CCCCGGCGCGCCTCATCGAATCTTTTTCCTGGGGGT3’）.

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した.

p27^{xic1}-FLAG/ pCS2AT+　*p27^{xic1}/ pCS2AT+*を鋳型にして，以下のようなプライマー組を用いて PCR 増幅した:

F:（5’CCCCGAATTCCACCATGGCTGCTTTCCACATCGCCCTG3’）

R:（5’CCCGGCGCGCCTCACTTGTCATCGTCATCTTTATAATCTCGAATCTTTTTCCTGG3’）.

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した.

p27^{xic1}D35-FLAG/ pCS2AT+　*p27^{xic1}/ pCS2AT+*を鋳型にして，以下のようなプライマー組を用いて PCR 増幅した．

F: (5’ CCCGAATTCCACCATGCTCTTCGGTCCTATCGATC3’)

R: (5’ CCCGGCGCGCCTCACTTGTCATCGTCATCTTTATAATCTCGAATCTTTTTCCTGG3’).

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した．

p27^{xic1}N64S-FLAG/ pCS2AT+　*p27^{xic1}-FLAG/ pCS2AT+*を鋳型にして，以下のようなプライマー組をそれぞれ用いて，PCR 増幅し，+192 の A を G に塩基置換した断片を作成した．

F1: (5’ CCCAAGCTTGATTTAGGTGAC3’)

R1: (5’ CTTTCAAAGTCAAAGCTCCACCTCTGACAG3’).

F2: (5’ CTGTCAGAGGTGGAGCTTTGACTTTGAAAG3’)

R2: (5’ GTAATACGACTCACTATAGGGC3’).

得られた二種類の断片は，塩基置換した箇所を含んで３０塩基弱の重複領域を持っている．これらを鋳型兼プライマーとして混合し，PCR 増幅した．都合良く増幅された断片があることを確認してから，*p27^{xic1}/pCS2AT+*を作成する際に用いたプライマー組で再度 PCR 増幅した．この断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した．

pax8/ pCS2AT+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下のプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCATCGATCCACCATGCCCAACAGCAGCATCA3’)

R (5’ CCCGGCGCGCCTACATAAGGTCATAGGCTC3’).

得られた断片を Cla1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した (Heller and Brandli 1999).

sox9/ pCS2AT+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下のプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCATCGATCCACCATGAATCTCTTGGATCCCTTC3’)

R (5’ CCCGGCGCGCCTAGGGTCTTGTGAGCTGT3’).

得られた断片を Cla1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した (Saint-Germain et al. 2004).

dlx5/ pCS2AT+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下のプライマー組で PCR 増幅した:

F (5’ CCCCGAATTCCACCATGACAGGAGTCTATGAGCGGAGA3’)

R (5’ CCCCGGCGCGCCTTAGTAGAGAGTCCCTGATGCCAA3’).

得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した．

pitx-1/pCS2AT+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下の縮重プライマー組で PCR 増幅した:

F1（5’ATGGAYKCCTTYAARGGWGGMATG3’）

R1（5’GCTGTTGTACTGTCAVGCGTTKAGSC3’）.

反応終了後，微量の反応液を鋳型として，以下のプライマー組でPCR増幅を行った:

F2（5’CCCGAATTCAATTTGGAAAGATTGCCTGAGAGTT3’）

R2（5’CCCGGCGCGCCGGGCTCTGAAGGCTGCTG3’）.

得られた断片をEcoR1とAsc1で切断し，同様に処理したpCS2AT+に連結挿入した.

X-MyT-1/ pCS2AT+　ツメガエルcDNAを鋳型にして，以下のプライマー組でPCR増幅した:

F（5’CCCCGAATTCCACCATGAATGTAGACAATGTTAACAAA3’）

R（5’CCCCGGCGCGCCTCACACCTTGATCCCTTTGACTGC3’）.

得られた断片をEcoR1とAsc1で切断し，同様に処理したpCS2AT+に連結挿入した.

foxE3/ pCS2AT-TAR+　ツメガエルcDNAを鋳型にして，以下のプライマー組でPCR増幅した:

F（5’CAGCCCCATGCCAAGCTCGC3’）

R（5’TAACCCAATAATTGATCTT3’）.

得られた断片をXcm1処理したpCS2AT-TAR+に連結挿入した.

fgf8/ pCS2AT+　ツメガエルcDNAを鋳型にして，以下のプライマー組でPCR増幅した:

F（5’CCCCGAATTCCACCATGAACTACATCACCTCCATCCTG3’）

R（5’CCCCGGCGCGCCCTACCGAGAACTTGAATATCGA3’）.

得られた断片をEcoR1とAsc1で切断し，同様に処理したpCS2AT+に連結挿入した.

fgfr4c/ pCS2AT+　ツメガエルcDNAを鋳型にして，以下のプライマー組でPCR増幅した:

F1（5’CCCATCGATAATAATATACACTTCTGGATTCC3’）

R1（5’CCCGGCGCGCCACATTTCTCTGTATTAAATAGATC3’）.

反応終了後，微量の反応液を鋳型にして，以下のプライミングでPCR増幅した：

F2（5’CCCGAATTCTGGCTGTAGCCATGGCC3’）

R2（5’CCCGGCGCGCCTATAATGTATAAAAGCATTTATGG3’）.

得られた断片をEcoR1とAsc1で切断し，同様に処理したpCS2AT+に連結挿入した.

notch2/ pCS2AT+　ツメガエルcDNAを鋳型にして，以下のプライマー組でPCR増幅した:

F（5’CCCGAATTCGGCCATTATTATTGTCATTCTA3’）

R（5’CCCGGCGCGCCGCCGACACTGCTGCATGAA3’）.

得られた断片をEcoR1とAsc1で切断して，同様に処理したpCS2AT+に連結挿入した.

L-maf/ pCS2AT+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下のプライマー組で PCR 増幅した:
F (5' CCCGAATTCCACCATGGCACTCGATGATCTACC3')
R (5' CCCGGCGCGCCTCACAGAAAGAGCTCAGCTC3').
得られた断片を EcoR1 と Asc1 で切断し，同様に処理した pCS2AT+に連結挿入した.

XHes2/ pCS2AT-TAR+　ツメガエル cDNA を鋳型にして，以下のプライマー組で PCR 増幅した:
F (5' CCACCATGGCTCCCAATGTAGCGC3')
R (5' TCACCACGGCCTCCAGATG3').
得られた断片を，Xcm1 処理した pCS2AT-TAR+に連結挿入した.

six6/ pCS2AT+　Zuber et al. (1999)を参考に作成した.

zic1/ pCS2AT+　Sato et al. (2005)を参考に作成した.

尚，作成したコンストラクトに関して，全て塩基配列決定を行って配列が正しいことを確認した.

3- 5　*in vitro* RNA プローブ合成

RNA プローブの合成には，市販の SP6, T3, T7 RNA polymerase (以下，pol.)を用いた．反応の際，基質として DIG RNA Labeling Mix (Roche #1277073)もしくは Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche #1685619)を使用し，Dig もしくは Fluorescein で UTP を標識したアンチセンス RNA プローブを合成した．ただし，発現量が低い遺伝子 (*pax8, six1, pitx-1, X-ngnr-1, X-delta-1, X-MyT-1, foxE3, fgf8, notch2, XHes2*) を検出する場合や，RNA 鎖が極端に短い (*Xhairy2a-5' UTR, Xhairy2b-5' UTR*) 場合は，MAXIscript Kit (Ambion AM1314 for T7, AM1310 for SP6)を使用した．この場合，上記の RNA Labeling Mix は使用できないため，キットのマニュアルに従って基質液を調整した．その際，Digoxigenin-11-UTP (Roche #1209256)もしくは Fluorescein-12-UTP (Roche #1427857)を使用した.

それぞれの遺伝子クローンについて，鋳型作成時の制限酵素と合成に用いた RNA pol.を下に記した．尚，(制限酵素，RNA pol.) である.

Xhairy2b-5' UTR/ pCS2AT+ (HindIII, T7 pol.)
Xhairy2a-5' UTR/ pCS2AT+ (HindIII, T7 pol.)
Xhairy2b/ pBS2KS+ (BssHII, T7 pol.)
otx2/ pBS2KS+ (EcoR1, T3 pol.)
pax6/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

pax8/ pCS2AT+ (HindIII, T7 pol.)

rx1/ pBS2KS+ (EcoR1, T7 pol.)

six1/ pGEM-T (Nco1, SP6)

six3/ pCS2AT+ (EcoR1, T7)

sox9/ pCS2AT+ (HindIII, T7 pol.)

dlx5/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

pitx-1/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

X-ngnr-1/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

X-delta-1/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

X-MyT-1/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

p27^{xic1}*/ pGEM-T* (SacII, SP6 pol.)

foxD3/ pGEM-T (Spe1, T7 pol.)

foxE3/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

foxG1/ pGEM-T (SacII, SP6 pol.)

cerberus/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

fgf8/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

fgfr4c/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

shh/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

notch2/ pCS2AT+ (EcoR, T7 pol.)

L-maf/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

γ1-crystallin (Not1, T7 pol.)

XHes2/ pCS2AT-TAR+ (EcoR1, T7 pol.)

six6/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

zic1/ pCS2AT+ (EcoR1, T7 pol.)

３－６　*in vitro* mRNA 合成

mRNA の合成には，mMessage mMachine Kit (Ambion AM1340 for SP6, AM1348 for T3)を使用した．鋳型作成時の制限酵素と合成に用いた RNA pol.を下に記した．尚，(制限酵素，RNA pol.) である．

c-β-gal/ pCS2+ (Not1, SP6 pol.)

Venus/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2a/ pBSKS+ (Not1, T3 pol.)

Xhairy2a/ pBSKS+ (Not1, T3 pol.)

Xhairy2a/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2b/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2a-CDS/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2b-CDS/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2a-MT/ pCS2+ (Not1, SP6 pol.)

Xhairy2b-MT/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

-mo Xhairy2a-MT/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

-mo Xhairy2b-MT/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

p27^{xic1}/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

p27^{xic1}-FLAG/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

p27^{xic1}Δ35-FLAG/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

p27^{xic1}N64S-FLAG/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

wnt3a/ pCS2AT+ (Not1, SP6 pol.)

XHR-1/ pBSKS+ (Not1, T3 pol.)

XHes2/ pCS2AT-TAR+ (Not1, SP6 pol.)

３－７　RT-PCR

健康なツメガエル胚を大量に準備し，st. 0, 9, 10, 11, 12, 14, 21, 29 の total RNA を精製した（各ステージで 300-500 個の胚が必要）. DNase1 処理をした 2　g の total RNA を使用し，逆転写(RT)を行った. RT 酵素は SuperScript II RTase (GIBCO-BRL #18064-014)を用い，プライマーは Random primer (invitrogen #48190-011)を用いた. RT 反応は，一般的な方法に従って行った. RT 産物を鋳型にし，PCR 増幅を行った. アニーリング温度は 66°C に設定し，合計25 サイクル増幅した. PCR に用いたプライマーは以下の通りである：

Xhairy2a, Xhairy2b

F (5’ AGCGCTGAGTCCGTGTGGAGACCATG3’),

R (5’ GCAGGGTCCCATAGAACGGAACCAA);

Xhairy2

F (5’ GATCGTAGCCATGAATTACC3’),

R (5’ GATAACAGGTCCGGGGCTGG3’);

histone H4

F (5’ ATTTATGAGGAAACTCGTGGGGTCC3’),

R (5’ TTATCCGCCGAAGCCGTAGAGAGTG3’).

PCR の際の Reference として，鋳型に *Xhairy2a/ pBS2KS+*と *Xhairy2b/ pBS2KS+*を使用した系を追加した. 100 bps 程度の断片を正確に分離する必要があったため，電気泳動には Tris-borate-ethylenediamine tetraacetic acid-buffered 8% acrylamide gel を使用した.

３－８　ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (Whole-mount *in situ* hybridization, WISH)

サンプルを MEMFA で３時間以上固定した．過固定を心配する必要はなく，実験の都合に合わせてほとんどの場合終夜固定した．固定したサンプルを 100%メタノールで置換し，-30°C で一晩以上保存した．メタノールを PBST(1x. PBS, 0.1% Tween-20)で希釈することで，サンプルのメタノール濃度を 75%, 50%, 25%の順に下げ再水和する．PBST で５分 x. 3 洗浄し，色素脱色のために Mayor’s bleaching solution (1% H_5O_2, 5% Formamide, 0.5x. SSC: Development 121: 767-777, 1995)に置換する．お菓子の空き箱のフタのようなものの内側をアルミ箔で覆い，そこにウェルプレートを静置し，ワークベンチに備え付けの蛍光灯スタンドを直上に配置，光脱色を行う．だいたい２時間で，完全に色素顆粒を除去できる．ただし，ピンセット等の金属を反応液に浸けてはならない．おそらくフェントン反応のようなことが起こり，突如サンプルが発泡する．脱色後，PBST で５分 x. 2 洗浄し，Hybridization buffer (1x. Denhart’s, 50% Formamide, 5x. SSC, 5mM EDTA pH 8.0, 1mg/ ml yeast total RNA, 0.2% Tween-20, 0.5% CHAPS, 100　g/ ml Heparin) と PBST を 1:1 で混ぜた液に５分サンプルを浸す．つぎに Hybridization buffer に置換して，68°C で３時間以上プレハイブリダイゼーションを行う．プレハイブリダイゼーションの後，サンプルが液面下にある状態を保ったままぎりぎりまでバッファーを捨て（変形を防ぐため)，Dig もしくは Fluorescein 標識プローブが１　g/ ml の濃度で添加された Hybridization buffer を加え，68°C で終夜ハイブリダイゼーションを行う．

プローブの入った Hybridization buffer を，サンプルが空気中に露出しない状態を保ったままぎりぎりまで除去し，2x. SSC (1x. SSC: 17 mM NaCl, 17 mM $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, pH 7.0)/ 0.3% CHAPS 溶液で１０分 x. 2 洗浄した．溶液を完全に捨て，0.2x. SSC/ 0.3% CHAPS 溶液で 60°C３０分 x. 2 洗浄した．この間の液交換では，サンプルが液面下にある状態を保って行う．1x. MAB (0.1 mM Maleic acid, 0.15 mM NaCl, pH 7.5)で５分 x. 2 洗浄する．この間の液交換でも，サンプルが液面下にある状態を保つ．溶液を完全に捨て，10% Lamb Serum (Gibco #16070-096) / 2% Blocking Reagent (Roche #1096176)/ 0.6x. MAB を加え，１時間室温でブロッキングする．同じ溶液で Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche #1093274)もしくは Anti-Fluorescein-AP, Fab fragments (Roche #11426338910)を 2000 倍希釈したものを抗体液とし，抗体液に置換した後，4°C で終夜反応させた．

MAB で３回リンスした後、同じく MAB で１時間 x. ４回洗浄した。この際、液量は通常の１．５倍使用した。５回目の MAB 洗浄は、４℃で終夜行った。

AP buffer (100 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 0.1344N NaOH, 1% Tween-20, pH 9.5 - 9.8) に５分浸してから、33.75 μg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche #1383213)/ 175 μ g/ ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt, Roche #1383221)/ AP buffer と置換して、遮光条件で発色反応を行った。尚，一般的なプロトコル

では，NBT は 337.5 μg/ml で使用することになっている．しかし，Ma らが報告したように，この濃度では背景染色が強過ぎて，発現の弱い遺伝子を長時間かけて検出することが難しい（Ma et al. 1996）．そのため，Ma らの提案にならって，１０分の１に減らして使用した．実際，これで染色が弱くなることは一切なく，尚かつ背景染色が弱いため，極めて優れた提案であったと言える．発色液は、白紙にかざしてみると極薄い黄色であるが、この色がなくなり透明になるかそれを通り越して薄桃色になったところで、発色液を交換して背景染色をできる限り防止する。発色時間は、遺伝子により、またプローブにより様々だが、終夜行う場合は直前に発色液を交換し、４℃で反応を行う。発色終了後は、MEMFA で３０分固定し、１００％メタノールに置換して背景染色を落とす。その後、観察する。胚の内部が染色されている場合は、Murray's solution (Benzyl Benzonate: Benzyl Alcohol = 2:1) に置換して透明化して観察する。この際、メタノールでの脱水が不十分な場合は Murray's が内部まで浸透しないため、十分に液交換して脱水する。

二重染色を行う場合は、ハイブリダイゼーションの際に、Dig 標識プローブと Fluorescein 標識プローブを同時に添加する。濃度は、それぞれが 1 μg/ ml である。以降の手順は、どちらか一方の抗体反応を行い発色、PBS 緩衝 4%パラフォルムアルデヒドによる終夜固定（４℃）で先行する AP の完全な停止、MAB でパラフォルムアルデヒドを十分洗浄した後、再びブロッキング、もう一方の抗体反応、発色、である。Dig と Fluorescein 標識について、どちらを一色目に持ってきても結果に差はない。ただし、発色基質の組み合わせと順序は極めて重要である。BCIP（水色）、BCIP-Red（5-bromo-6-chloro-3-indoxyl phosphate, *p*-toluidine salt, Biotium #10004, 赤色, 175 μg/ ml)、NBT/BCIP（濃い紫色）の三色から二色を選ぶことになるが、BCIP-Red と NBT/BCIP の組み合わせは、BCIP-Red がいとも容易に紫に変色してしまうため、実際問題として不可能である。結果として、BCIP: BCIP-Red と BCIP: NBT/BCIP の組み合わせのどちらかを選択することになる。BCIP, BCIP-Red ともに感度が悪いため、染め分けたい遺伝子の一方の発現が弱い場合は後者の組み合わせを選択する（どちらの発現も弱い場合は、二重染色不可である）。そうでない場合は、前者を選択する。どちらを選択しても、必ず BCIP を一色目として使用する。理由は、BCIP-Red はすぐに背景染色が強くなってしまい二色目の発色に悪影響を与えてしまうこと、BCIP の優れた増感剤である NBT はコンタミレベルで存在するだけで BCIP に作用してしまい尚且つ NBT を完全に除去できないということ、の二つである。通常の WISH よりも背景染色に対して十分注意を払い、こまめに液交換することと、欲を出さずにある程度識別レベルまで発色したら思い切って発色を停止することが重要である。ツメガエル胚における二重染色は基本的に難しい技術であり、ちょっとした偶然に左右される要素が大きいので、ある程度納得できる結果が得られるまで何度も繰り返すことが必要と思われる。

３－９　リン酸化ヒストン H3 染色 (Phospho-histone H3 staining, PHH3)

ゼブラフィッシュ胚で行われたL ger と Brand の方法 (Leger and Brand 2002) を改変して，WISH と共役させて行った．WISH 前の固定で，過固定を心配する必要はない．発色には胚の色素と同じ色調の DAB を用いるので，明瞭な結果を得るために WISH の段階で徹底した脱色を行うべきである．WISH での染色終了後，PBST にて５分 x ３回サンプルを洗浄する．1% BSA/ PBST を用いて，室温で１時間ブロッキングする．抗 PHH3 抗体液 (Upstate #06-570, rabbit polyclonal, 1:300 in 1% BSA/ PBST) に置換して，4°C で終夜反応させる．PBST で３回リンスした後，PBST で 30 分 x．4 洗浄し，1% BSA/ PBST で５分処理する．抗ウサギ IgG HRP conjugated (Promega W4011, goat polyclonal, 1:200 in 1% BSA/ PBST)に置換して，4°C で終夜反応させる．PBST で３回リンスした後，PBST で 30 分 x．4，１時間 x．2 洗浄する．100 mM Tris・HCl (pH 7．6) に５分浸した後，H_2O_2 含有発色基質液に置換する．SIGMA*FAST* 3, 3’-Diaminobenzidine (DAB) 錠剤キット (SIGMA D-4293) を用いた．発色終了後，MEMFA で３０分固定し，100%メタノールに置換した後，観察した．尚，Upstate は Millipore に合併され，本研究に用いたポリクローナルの抗 PHH3 抗体は生産中止となった．この代替品として，Cell Signaling Technology のウサギポリクローナル抗 PHH3 抗体 (#9701) を使用するのが望ましいと考えられる．この理由は，以下に挙げる点が旧 Upstate の製品と同じであるからである：免疫にウサギを用いていること，抗原として用いたペプチド配列が同じであること，免疫の際に用いられた担体が同じであること，抗血清から Protein A 吸着カラムで IgG を精製していること，免疫組織化学に使用可能であること，である．ただし，ブロッキングと抗体の希釈については，新たに条件を検討する必要があることを付け加えておく．

３－１０ Hydroxyurea/ Aphidicolin (HUA) 処理

Hydroxyurea (SIGMA H8627) は水に溶かし，1M のストック溶液として 4°C で保存した．Hydroxyurea は水生動物に対する遺伝毒性が極めて高いので，廃液の取り扱い等に十分注意する．Aphidicolin (SIGMA A0781) は DMSO に溶かし，45mM のストック溶液として-30°C で保存した．使用の際は，0．1 x．Barth 溶液で希釈した．終濃度を Hydroxyurea 20 mM, Aphidicolin 150 M になるように調整し，HUA 溶液とした．HUA の DMSO 濃度が 0．3%となったため，コントロールには 0．3% DMSO (in 0．1 x．Barth 溶液) を用いた．HUA 処理の際には，12 穴ウェルプレートを使用し，ウェルには溶液が 1．5ml 入った状態で実験を行った．ウェルに胚を移す場合は，先端が切除されたチップを装填した P1000 ピペットマンを用いた．このとき，重力でチップの先に胚が集まるまで静止し，そのままチップの先を穏やかに溶液の液面に接することにより，ピペッティング操作なしに重力で胚が溶液中に移るように心がけた．これにより，チップ中の 0．1 x．Barth の混入を最小限に抑えることができるものと考えられる．実験で設定した HUA 処理時間が経過した時点で，WISH 用に即座に固定する胚以外は，0．1 x．Barth に移してそのままオタマジャクシ幼生になるまで培

養した．このとき薬剤を洗う目的で，３ml の 0．1x Barth が入ったウェルに上述の要領で胚を移して５分放置し，そこから 2ml の 0．1 x．Barth が入った別のウェルに胚を移し替えて培養した．

３－１１　ホールマウント TUNEL

Hensey と Gautier の方法 (Hensey and Gautier 1998) を一部改変して行った．サンプルを MEMFA で１時間固定し（終夜固定でも特に問題ないと思われる），100%メタノールに置換して一晩以上保存する．次に，WISH と同じ要領でメタノールから徐々に PBST に置換し，Mayor's bleaching solution を用いて光脱色する．脱色後，PBS で 15 分 x．2 洗浄する．1x．Terminal Deoxynucleotidyl Transferase buffer (1x．TdT buffer: 100 mM HEPES, 8 mM $MgCl_2$, 0.1 mM DTT, 0.02% BSA, pH 7.2) に 30 分 x．2 浸す．ここで，TdT バッファーは，Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Takara #2230A) に 5 倍濃縮のものが添付されているが，ホールマウントで行う場合は到底足りないため（量を絞るとバッファー交換が不十分になり TdT 反応で失敗する），５倍濃縮のものを製品の説明書の組成通りに自作して保存した．基質と酵素が添加された反応液 [2　M Digoxigenin-11-dUTP (Roche #1093088, 原液が 1mM なので 500 倍希釈), 150U/ ml TdT] と置換して，室温で終夜反応させる．1 mM EDTA/ 1x．PBS で 65°C ３０分 x．2 洗浄する．この際，２回目の液交換では，サンプルがぎりぎり液面下にあるぐらいまで液を捨て（熱処理で柔らかくなっているためサンプルが変形しやすい），前液が残った状態で２回目の PBS を通常量加える．1x．MAB で１時間 x．4 洗浄する．この際，１回目の液交換のみ，前ステップと同様に，完全な液交換を避ける（同様の理由）．ブロッキング以降は，WISH で相当するステップと同じであるので省略する（抗 Dig-AP を用いる）．発色終了後は，MEMFA で３０分固定し，100%メタノールに置換して，観察した．

３－１２　パラフィン包埋と切片作成

100%メタノール中で保存しているサンプルを，100%メタノールで 2 回リンスしたのち，100%メタノールで満たされたガラス製バイアルに移して３０分以上透徹させた．以降，次に示す順で溶液を置換し，サンプルを脱水・脱脂させ，パラフィン (Pathoprep568, Wako Chemicals #162-18961) を透徹させた（時間はそれぞれ３０分以上だが，WISH などで染色したサンプルを包埋する場合は，キシレンで脱色してしまうので，メタノール／キシレン，キシレン，キシレン／パラフィンの処理をそれぞれ３０分きっかりで終えるべきである）：メタノール／キシレン，100% キシレン，キシレン／パラフィン，100% パラフィン I，100% パラフィン II．キシレン／パラフィン以降は常温で固体のため，７０℃に加熱して溶かしたものを使用した（ハイブリオーブンを使用し，溶液が外に出る時間は極力短くするように努力する）．６０℃でも十分に溶けるが，包埋のときにすぐに固化して操作が難しくなるので，熱くても我慢して７０℃に設定したほうが良い結果が得られる．また，メタノール／

キシレンにサンプルを移したときに，溶液が濁ったように見える時がある．これは，サンプルの完全な脱水ができていない証拠であるので，すぐに２回ほど 100%メタノールでリンスして，さらに１時間透徹させる．これを無視して進めると，パラフィンがサンプルに浸透せず，パラフィンブロックを薄切する際にサンプル部分が砕けてしまうので，視覚による最大限の注意が必要である．パラフィンを透徹させた後，アルミ箔で作った鋳型にサンプルとパラフィンを流し込む．このとき，最初にパラフィンのみを少量流し込んで緩やかに固化し始めたのを確認してから，サンプルとパラフィンを流し込む．これにより，サンプルが鋳型の底に落ちることを防止できるため，位置の調整が容易になる．鋳型にサンプルを移し，即座に実体顕微鏡下でサンプルの位置調整を行う．この際，アルコールランプで赤熱させたピンセットを用いることで，パラフィンの急速な固化を遅らせることができる．調整終了後，約１時間静置して，表面を固化させる．アルミ箔を除去し，氷水にブロックを１時間浮かせて急速に固化させる．このステップにより，パラフィン分子の配列が揃った均質なブロックを得ることが出来るので，以降の薄切作業でより良い結果に結びつく．作業時間の都合により，常温で終夜固化させても問題ない．

切片にする面に直交する一面を，サンプルが十分に透けて見えるまでトリミングする．これにより，ブロックを試料台に固定する際の方向の微調整が容易になる．ブロックを試料台に固定する．固定する面を少し溶かすので，試料台に接する面は極力トリミングしないほうが良い．直方体の形状を維持したまま不必要な部分をさらに除去する．初期胚のサンプルは直径が 1 mm 以下になっているが，それに合わせてブロックをトリミングしすぎると扱いが難しくなる．経験上，ブロックの最も短い辺が 4 mm をきらないほうが良いと思われるが，6 mm 以上あっても無駄である（オタマジャクシ幼生の場合を除く）．ミクロトームの刃と平行になるべきブロックの二面は，互いに平行になるようにトリミングする．

切片の厚さは，用途により適宜変更する．WISH サンプルの場合は 14　m 厚で，免疫染色の場合は 10　m 厚で切片にする．オタマジャクシ幼生をヘマトキシリンなどで染色するだけの場合は，6-10　m 厚でもよい．切片をスライドガラスに回収する際は，切片がなるべくスライドガラスの中央に集まるように心がける．端に設置すると，免疫染色や切片 *in situ* ハイブリダイゼーションの過程で溶液に覆われない部分に切片がきてしまうことがある．スライドガラスは，親水性の MAS コートが施されているものが良い．パラフィン伸展機を 40°C に設定し，その上にスライドガラスを静置切片して，終夜伸展する．最低何時間行えばよいか分からないが，基本的に終夜伸展させれば問題ない．

WISH サンプルは，脱パラフィンのみ行いそのまま封入するが，切片を染色に用いる場合は，脱パラフィン，再水和，染色，脱水，封入の手順を踏む．特に標記がない場合の処理時間は５分である．100% キシレン I（10 分　30 分），100% キシレン II（10 分　30 分），100% キシレン III（10 分　30 分），100% エタノール I，100% エタノール II，90% エタノール I，70% エタノール I，50% エタノール I，流水（30 分），水（ヘマトキシリン染色）

もしくはPBS（酵素抗体法免疫染色），各種染色（15分-終日），50% エタノール II，70% エタノール II，90% エタノール II，100% エタノール III，100% エタノール IV，100% キシレン IV，100% キシレン V，100% キシレン VI，封入．封入剤には，Entellan new（Merck HX757639）を用い，スポイトで一定距離をおいて三カ所スライドガラスに滴下し，気泡が入らないように注意しながらカバーガラスをゆっくりと乗せる．封入剤を固化させるために，終夜平らな台の上で静置する．オタマジャクシ幼生の眼の観察には，OLYMPUS IX71を使用し，x．200 - x．600で形態を観察した．

3－１３　BrdUラベリングと検出

Hardcastleと Papalopuluによる方法（Hardcastle and Papalopulu 2000）を参考にして，BrdU labeling and detection kit II（Roche #1299964）を用いた．後期原腸胚（st. 12-12.5），初期神経胚（st. 13），もしくは後期神経胚（st. 18）の神経板前方部に二カ所（正中線をはさむ），肥胚腔に一カ所，それぞれ10 nlのBrdU溶液（キットに添付のもので，濃度は10 mMである）を微注入する．微注入は，1x. Barth中で行い，HUA等の薬剤処理中の場合は，薬剤の効果を切らさないために可能な限り短時間で済ませることを心がける．神経板に注入する際は，浅めに針を入れ神経板と中胚葉の間の空間に溶液が拡散できるようにする．微注入後，19°Cで１時間半培養する．もし，神経胚以降でラベリングを行う場合は，１時間の培養でよい．ただし，どのステージでも，２時間以上の培養を行うとシグナルが強すぎて結果の判定が難しくなるので，長時間のラベリングは避けるべきである．培養後，即座にMEMFAで固定する（1時間で十分だが，後述のように抗原露出処理を行うので過固定を心配する必要はなく，よって終夜行っても問題ない）．固定が終了次第，100%エタノールでよくリンスして完全に置換し，半日以上-30°Cで保存する．このステップが不十分の場合は，脱色の際にサンプルが発泡することがあるので注意する．

エタノールに置換したサンプルを，WISHと同じ要領でPBSに段階的に置換する．PBSで５分 x. 3洗浄したのち，WISHと同じ要領で脱色する．発色には胚の色素と同じ色調のDABを用いるので，明瞭な結果を得るために徹底した脱色を行うべきである．脱色後，PBSで５分 x. 2洗浄したのち，2N HCl中で１時間放置する．PBS/ 0．3% TritonX-100で５分 x. 2洗浄する．キットに添付のIncubation Bufferに５分浸した後，抗BrdU抗体液（キットに添付のもので，Incubation Bufferで1:60に希釈する）に置換して37°Cで３時間反応させる．キットの抗体液には微量のDNaseが含まれているため，このステップで二重鎖構造を部分的に破壊し，抗原であるBrdUを露出させて増感することができる．酵素の至適温度として37°Cが選択されているので，室温で行ってはならない．反応終了後，PBSで３回リンスする．ウェルの上限までPBSを加え，4°Cで終夜洗浄する．25 mM Tris buffered saline (TBS)/ 0．1% Tween-20で５分洗浄する．20% lamb serum in 25 mM TBS/ 0．1% Tween-20に置換して５分放置する．抗マウス IgG-HRP conjugated 溶液(Promega W402B, donkey

polyclonal, 1:50 in 20% lamb serum in 25 mM TBS/ 0. 1% Tween-20)に置換して，室温で５時間反応させる．25 mM TBS/ 0. 1% Tween-20 で３回リンスしたのち，液をウェルの上限まで加え，4°C で終夜洗浄する．25 mM TBS で５分洗浄したのち，H_2O_2含有 DAB 溶液で発色させる（SIGMA*FAST* 3, 3'-Diaminobenzidine, SIGMA D-4293,）．発色後，MEMFA で３０分固定し，100%メタノールに置換した後，観察する．ホールマウントでの観察後，後述のようにサンプルをパラフィンに包埋して 10　m厚の切片を作成する．サンプルごとに５枚の連続する切片で BrdU 陽性細胞を計数して，平均値を算出する．計数には，NIH ImageJ を用いた．尚，BrdU の検出は，WISH から引き続いて行うことも出来る．その場合は，発色終了後，100%メタノールで 30 分処理し，再水和して 2N HCl 処理に入る．WISH ですでに色素顆粒を除去しているので，脱色処理は不要である．

３－１４　免疫組織化学

オタマジャクシ幼生を MEMFA で終夜固定し，100%メタノールに置換する．切片作成の項で説明されたように切片を作製し，脱パラフィンし，100%エタノールに置換する．0.3% H_2O_2/ メタノールで２０分処理して，内在性のペルオキシダーゼを失活させる．エタノール下降系列で，再水和し，15 分程度水洗する．1x. PBS で５分処理し，3% BSA/ PBS で室温１０分間ブロッキングする．一次抗体で室温 30 分反応させる．PBS で５分 x. 3 洗浄した後，二次抗体で室温３０分反応させる．PBS で３分 x. 5 洗浄し，Vector VIP（紫：Vector VIP Substrate Kit For Peroxidase, Vector Laboratories SK-4600）もしくは DAB（茶）で発色させる．水道水で５分ゆすいで反応を停止させ，対比染色を行う．Vector VIP を用いた場合は（acetylated tubulin の検出に使用），メチルグリーン（VECTOR Methyl Green Nuclear Counterstain, Vector Laboratories, H-3402）で 60°C３０分核染色する．滅菌水でリンスした後，0.05% acetic acid/ acetone で５分処理してメチルグリーンの背景染色を除去する．DAB を用いた場合は（γ1-crystallin の検出に使用），Mayor's Hematoxylin（Vector Hematoxylin QS, Vector Laboratories, H-3404）で 5-10 秒発色させ（色が強いので，発色時間を長くしない），水洗する．いずれの場合も，脱水処理の後，Entellan New で封入した．

使用した一次抗体は以下の通りである．抗 acetylated tubulin（mouse monoclonal, SIGMA T6793, 1:1000），抗 γ1-crystallin（mouse monoclonal: 1:30, 奈良先端科学技術大学院大学　荻野肇 博士に頂いた）．二次抗体には抗 mouse IgG-HRP Conjugate（goat polyclonal, Promega, W402B, 1:2000）を使用した．抗体の希釈には，1% BSA/ PBS を使用した．

３－１５　レポーター検定

ホタルルシフェラーゼを用いたレポーター検定を行った．レポーターベクター N6; β-actin: luc は，β-action の basal promoter の上流に Xhairy2 の認識配列である N-box (CACGAG)が６つ連結され，これらの制御下にホタルルシフェラーゼが配置されているもので

あり，京都大学ウィルス研究所の影山龍一郎先生に頂いた．レポーター検定に用いる試薬一式は，Luciferase Assay System (Promega　E1501)を使用した．

4細胞期の予定腹側帯域に，N6; β-actin: luc のみ，もしくは N6; β-actin: luc と *Xhairy2b* などの mRNA を共注入した．ベクターと mRNA の種類，量は本文中もしくは図の解説に記載した．微注入した胚を 16°C で st.10 まで培養し，50　l の Passive Lysis Buffer が入った 1.5 ml チューブに胚を１個入れ，ホモゲナイズした．実験に用いる胚を全てホモゲナイズし，測定が始まるまで４℃で保存した．以降は，一つの実験区ずつ順次まとめて行う．溶出液を４℃ 15,000 rpm で５分間遠心分離して上清を 20　l 回収し，計測用キュベットに入れた (Promega E2371)．測定を行う間に，次の実験区のサンプル全てを遠心しておく．ルシフェリン液はキットに添付の LARII 液を使用した．-80°C で保存してあるものを解凍し，常温に戻してから使用した．発光反応のため LARII は 50　l 添加する際，ルミノメーター (TURNER DESIGNS TD-20/20) に搭載されている自動注入機能を活用した（マイクロピペッターを用いて手動で添加することもできるが，反応時間に僅かな差が生じ数値のばらつきを助長することになるので，自動注入装置が故障しない限り避けた方がよいと思われる)．溶出液の入ったキュベットをセットしてから計測ボタンを押すと，自動で LARII が注入され，設定した時間計測せずに反応させ，設定した時間計測する．実験によって多少変更したが，ほとんどの場合は，反応１０秒，計測１０秒に設定した．また，実験を行う際は毎回必ずバックグラウンドノイズを測定し，実験区の計測値から減算するように設定した．バックグラウンドノイズの測定には，同じ時期に回収した正常胚の溶出液を用いた．全ての比較において，それぞれ２０個の胚を使用し，平均値と標準偏差を算出した．バックグラウンドノイズの測定には，正常胚を３個使用し，その平均値を使用した．本質的に，感度は高いが精度の悪い実験であるため，使用する胚の選定には最大限注意を払った．また，酵素反応を利用する実験のため，溶出液の温度がサンプルごとに一定になるように気をつけた．

３－１６　ウェスタンブロッティング

4細胞期ツメガエル胚の動物極付近に，抗原タグ付きコンストラクの mRNA を微注入し，st.9-10 まで培養した．植物半球はとくに卵黄が多く含まれており，SDSPAGE において泳動パターンが乱れる原因となるため，動物極付近（アニマルキャップ）だけを切り取って，直接 2x. Sample buffer (10% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose, 0.01% BPB, 125 mM Tris・HCl pH 6.8)に移してホモゲナイズ，溶出（１キャップあたり buffer は 10　l)，加熱変性処理を行った．遠心した後に上清を回収して，色素上皮などのゴミを除去した．過剰発現させるタンパクの性質にもよるが，load 量を増やしたい場合は微注入の段階で mRNA 量を増やすべきである．Sample buffer 単位量あたりのキャップの数を増やすことによっても load 量を増やすことができるが，経験的に，3 キャップ/ 10　l を超えると電気泳動パターンが乱れることがあり，5 キャップ/ 10　l を超えると，変性処理後，室温に戻るにつれタンパク溶

液がゲル化することがある（当然，泳動できない）．

SDSPAGE ならびにウェスタンブロッティングは，一般的な方法・装置により行った．尚，転写にはニトロセルロース膜（PROTRAN, Schleicher & Schuell BA85）を用いた．ブロッキングのステップ以降を記す．ブロッキング溶液には，5%スキムミルク/ PBST（スキムミルクは，市販のものならどれでも良いと思われるが，顆粒状のものが溶けるのが早く扱いやすい）を用い，室温で１時間ブロッキングした．一次抗体，二次抗体ともに，5%スキムミルク/PBST で希釈し，抗体液とした．使用した抗体と希釈率は以下の通りである：抗 FLAG-M2（mouse monoclonal, SIGMA F3165, 1:2000），抗マウス IgG-HRP Conjugate (goat polyclonal, Promega W402B, 1:3000)，抗 c-myc-Peroxidase (mouse monoclonal, Roche #11814150001, 1:1000)．抗体反応は室温で２時間もしくは 4°C で終夜行い,抗体反応後は PBST で４分 x.４洗浄した．化学発光反応の直前に，1x. PBS に膜を１０分浸して，Tween-20 を洗い流した．これは，Tween の存在下で発光反応を行った場合，染まり斑が出やすいと報告されているからである（Millipore 製品カタログによる）．発光反応には，Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare RPN2209)を用い，検出には X 線フィルム（Medical X-ray Film MXJB Plus, Kodak #6040695）を使用した．

４．結果

４－１　*Xhairy2* の発現パターン

Xhairy2 の神経板前縁における発現（図９ b, e, h）は PPE に対応しているように見える．以前の研究で，神経板の縁の発現のうち，側方部分が神経堤の形成に非常に重要であることが明らかになっていた（Nagatomo and Hashimoto 2007）．しかし，前方部分についてはその機能が未知であった．この前縁の発現は，外胚葉の深層のものである（図９ c, c', f, f', i, i'）が，これは PPE 遺伝子の発現層である（Schlosser and Northcutt 2000）．逆に表層は，セメント線の形成に関わる遺伝子群の発現領域である（Drysdale and Elinson 1992; Sive and Bradley 1996）．この *Xhairy2* の発現パターンは，よく知られた PPE 遺伝子である *dlx5*（図９ j-r'）とある程度共通のものである．*dlx5* は，以降の発生で，レンズプラコード以外の全ての頭部感覚器プラコードで発現することが知られている（図４ C; Schlosser and Ahrens 2004 が参考になる）．PPE 発現の開始時期に注目してみると，*Xhairy2* は中期原腸胚（st.11.5-12）の時期で明瞭であるのに対して，*dlx5* は後期原腸胚（st.12.5）ではっきりとした発現を示す（図９ b, e, h と図９ k, n, q を比較）．これらの事実は，*Xhairy2* は PPE

をカバーする最も発現時期の早い遺伝子の一つであることを示唆している．さらに，神経胚と尾芽胚で *Xhairy2* の発現をみてみると，神経堤の前方の領域，即ち LF ないし PLE らしき領域に発現が見られた（図９－２）．

ゼブラフィッシュ *her9* 遺伝子や，マウス *Hes1* 遺伝子はアミノ酸配列の比較から *Xhairy2* の相同遺伝子であると言えるが（図１０ A），発現パターンについても，神経板前縁の発現が共通のものとなっている（図１０ B-E）．ゼブラフィッシュやマウスでは，この発現が神経板の内側であると認識されている．また，この前縁の発現が WISH のレベルで明瞭に確認できるのは，ゼブラフィッシュでは後期原腸胚期（95% Epiboly，図１０ B, C; Leve et al. 2001），マウスでは神経褶が形成される時期（E8.5，ツメガエル中期神経胚期に相当，図１０ D; Lee et al. 2005）であることから，*Hes1* の発現開始時期が *Xhairy2, her9* と比較すると少し遅いことが分かる．ニワトリでは，*C-Hairy1* 遺伝子が，アミノ酸配列レベルでは *Xhairy2* の相同遺伝子にあたるが（図１０ A），こういった初期の発現は見られないし，解析もされていない（体節形成に関するものに偏っている；例えば Dale and Pourquie 2000）．ただ，概して，進化的保存度の高い部類に入ることは間違いないと言える．

４－２　*Xhairy2* の機能阻害は球状レンズ構造の消失を引き起こす

Xhairy2 の PPE 発現が持ち得る機能を調べるために，モルフォリノアンチセンスオリゴ（以下，MO）によって *Xhairy2* の機能阻害を行った（Xhairy2 MO: 材料と方法の部に記載；効果については，図１１と Murato et al. 2007 が詳しい）．コントロール MO（以下，Co MO: 3.4 ng）もしくは Xhairy2 MO（6.9 ng）と *EYFP* mRNA（400 pg）を８細胞期の背側動物極側１割球に微注入した．St.42 のオタマジャクシ幼生のうち，EYFP 蛍光が頭部表皮で見られるものだけ（図１３ a, e）を集めて解析を行った．外部形態では，Xhairy2 MO 注入胚で，注入側の眼が，未処理側と比較して若干小さくなる傾向が見られたが（84%, n = 62; 図１３ e），その他については目立った変化は見られなかった．そこで，組織切片を作成して，特に頭部感覚器の形態に着目しながら慎重に比較を行った．そのうち，嗅塊（嗅覚器官；図１２ i, j）と耳胞（内耳原基；図１２ d, e）については，顕著な変化が見られなかった．しかし，興味深いことに，Xhairy2 機能阻害胚で，球状レンズ構造の消失が見られた．完全な消失はほとんど見られなかったが，大きさの差こそあれ細胞塊のような状態になっていた（n = 6; 図１３ f: Co MO, n = 5; 図１３ b）．Co MO を 6.8 ng で用いた場合に，こういった眼の異常は一切見られなかったことから（図１３－２ b），Xhairy2 の機能阻害による影響であると言える（以降も，Co MO は 3.4 ng で使用している）．Xhairy2 機能阻害眼で見られたレンズ様の細胞塊が，レンズ細胞としての性質を維持しているのか確認するために，γ1-crystallin の免疫染色を行った．その結果，全てのサンプルがγ1-crystallin 免疫陽性であることが明らかになった（Xhairy2 MO: n = 5, 図１３ f; Co MO: n = 2, 図１３ b）．いずれにしても，これらの結果は，Xhairy2 機能阻害がレンズ形成の不全を引き起こしたことを示唆している．

脊椎動物の眼の形態形成は段階的な課程である．発達中の網膜原基が隣接する（神経板期）

もしくは覆いかぶさる（神経管期）表皮にシグナルを送り，結果としてレンズ系譜表皮の運命が徐々に決定されていく（図５）．この観点から，Xhairy2 機能阻害胚の眼で見られた表現型は興味深い．つまり，少なくとも形態のレベルでは正常に見える網膜を有しているにも関わらず，正常な球状レンズの構造が消失していることから，レンズ系譜が特異的に影響を受けていることが示唆されるからである（図１３ f, h, h'）．眼が成熟するにつれて，発達中のレンズと発達中の網膜のコミュニケーションは双方向的になるため，レンズが網膜形成に必要とされる（例えば Ashery-Padan et al. 2000）．この意味で，Xhairy2 機能阻害眼で，網膜の形態に多少の変化が見られるのは（図１３ g'と h'を比較），レンズの正常な活性が失われていることによると推測できる．*Xhairy2* が発現する PPE と思われる領域は LF を含んでおり，これが PLE, LP へと順に発生していく．以降は，*Xhairy2* がレンズ形成の初期過程に果たす役割に注目して解析を行った．

４－３　*Xhairy2* の機能阻害により PLE や LP でのマーカー遺伝子の発現が減少するが網膜マーカー遺伝子の発現には変化がない

Xhairy2 機能阻害の影響をより詳細に知るために，後期尾芽胚においてレンズ系譜と網膜系譜両方の遺伝子発現の変化を調べた．Xhairy2 MO もしくは Co MO と *clacZ*, *EYFP* mRNA を８細胞期の背側動物極割球１割球に微注入し，培養した．尾芽胚期に EYFP 蛍光に基づいて選別し，st. 25, 28, 32 で固定し，モルフォリノの分布領域を可視化するために X-gal で染色した．レンズ系譜を含む領域で X-gal のシグナルが見られたサンプルのみを用いて WISH を行った．LP では，レンズ形成に重要な二つの転写因子 *foxE3*（ツメガエルではもしくは *lens1*; Kenyon et al. 1999; Ogino et al. 2008）と *L-maf*（Ogino and Yasuda 1998; Ishibashi and Yasuda 2001）が発現している．Co MO 胚では，*foxE3*（正常 93%, n = 27; 図１４ b, b'），*L-maf*（正常 86%, n = 28; 図１４ c, c'）ともに発現に変化は見られなかった．しかし，Xhairy2 MO 胚では，*foxE3*（減少 73%, n = 30; 図１４ h, h'），*L-maf*（減少 76%, n = 34; 図１４ i, i'）ともに，注入側で発現の減少もしくは消失が見られた．

notch2 は予定レンズ領域を含む頭部外胚葉で発現しており，Notch シグナルが *foxE3* の発現における必須の構成因子であることが報告されている（Ogino et al. 2008）．Xhairy2 MO 注入胚において，PLE, LP 領域で *notch2* の発現の減少が見られた（減少 47%, n = 34, 図１４ g, g'）．Co MO 注入胚では顕著な変化は見られなかった（正常 97%, n = 35, 図１４ a, a'）．*γ1-cry* は脊椎動物に共通の *crystallin* で（Offield et al. 2000），レンズの分化マーカーである．Xhairy2 MO 注入胚では，予想通り，その発現に顕著な減少が見られた（減少 90%, n = 30; 図１４ j, j'）．Co MO 注入胚では，変化は見られなかった（正常 89%, n = 18; 図１４ d, d'）．

重要なことに，Xhairy2 MO, Co MO いずれを注入しても，網膜マーカー遺伝子である *rx1*（Mathers et al. 1997）の発現に顕著な影響が見られなかった（Xhairy2 MO: 正常 84%, n =

25，図１４ k，k’；Co MO：全て正常 n = 23，図１４ e，e’）．同様の結果が，別の網膜マーカー遺伝子 *six6*（もとは *XOptx2*：）の発現変化についても得られた(Xhairy2 MO：正常 84%，n = 33，図１４ l，l’；Co MO：正常 97%，n = 32，図１４ f，f’）．これらのデータは，先述の形態のデータ（図１３）と一貫性を示しており，*Xhairy2* が少なくとも PLE 形成の時期からレンズ系譜の細胞で特異的に必要とされていることを示唆している．

４－４　神経胚において *Xhairy2* は LF の形成に必要とされる

ここまでの結果は，*Xhairy2* が PLE，LP の形成に必要であることを示している．そこで，次に，神経胚における LF の形成に *Xhairy2* が必要であるかを調べた．LF は，PPE 内のレンズ運命にバイアスのかかった表皮で（図１５ a)，中期神経胚期に，隣接する前方部神経板から出されるシグナルに応答して誘導されると報告されている（Zygar et al. 1998)．LF は，*pax6*（Hirsch and Harris 1997; Li et al. 1997; Zygar et al. 1998）や *six3*（Zhou et al. 2000）の神経板の外側の発現により標識され，これらの発現は神経板内の予定網膜領域の発現とは独立している（図１５ b，d)．しかし，これまで *pax6, six3* の LF 発現に関して，それが本当に神経板外側の表皮領域に位置しているのか確認されていなかった．そこでまず，二重染色によりこれを検証した．中期神経胚において，*Xhairy2* は神経板を縁取るように発現しているが，これと *pax6, six3* をそれぞれ二重染色すると，確かに発現の一部が神経板の外側でなおかつ PPE 領域内にあり，LF の発現と考えて相違ないと判断できた（図１５ c，e，f)．さらに，LF 発現の開始時期を見るために，初期神経胚から後期神経胚までを *pax6* と *six3* で染色した．すると，st.14 あたりから弱いシグナルが観察され，st.15 でそれが明確になることが明らかになった（図１５ g，h)．この観察事実は，頭部感覚器官プラコードの運命決定が中期神経胚で起こっているという，Jacobson の回転実験から得られた示唆（Streit 2004 が参考になる）とよく合致する．

Xhairy2 機能阻害が st. 15 において *pax6, six3* の LF 発現のみに影響を与えるのか MO 微注入により検証した．Xhairy2 MO 注入胚では *pax6*（減少 66%，n = 83，図１６ b)，*six3*（減少 73%，n = 51，図１６ d）の LF 発現が顕著な減少を示した．Co MO 注入胚では，全く変化が見られなかった（*pax6:* 正常 99%，n = 69，図１６ a；*six3*：正常 98%，n = 54，図１６ c)．Co MO を 6.8 ng 注入した場合も変化が見られなかった（*pax6*：正常 94%，n = 17，図１３－２ b)．重要なことに，これらの MO 注入胚で，*pax6, six3* の予定網膜領域の発現には影響が見られなかった．また，st. 17 において，Xhairy2 MO による *pax6* の LF 発現は減少するが(72%，n = 68，図１６ g)，MO 結合配列を欠損した *Xhairy2b* mRNA を 20 pg 共注入することによってこれが緩和されることから（減少 35%，n = 81，図１６ h，i)，LF 消失の表現型は *Xhairy2* が特異的に機能阻害された結果であると言える．St.18 において，*pitx-1* はセメント腺原基と LF に発現が見られる（Hollemann and Pieler 1999)．Xhairy2 MO 注入よって，*pitx-1* の LF 発現が，完全な消失は見られないものの，減少した（減少 60%，n = 25，図１６ f)．Co MO

注入胚では，変化が見られなかった（全て正常， n = 24，図１６ e）．以上の結果は，*Xhairy2* が網膜系譜の影響から独立して LF の形成に必要であることを示唆している．

４－５　*Xhairy2* 機能阻害は PPE マーカー遺伝子の制御に選択性を示す

神経管の形成後の感覚器官プラコードや神経プラコードを標識する遺伝子の多くは，神経板期からすでに発現を開始していることが知られている（Schlosser and Ahrens 2004; Streit 2004; Schlosser 2006）．ツメガエルでは，*six1*（Pandur and Moody 2000）や *dlx5*（以前は X-dll3: Papalopulu and Kintner 1993; Luo et al. 2001）といった遺伝子がよい例だが，発現パターンに共通性が見られる：*Xhairy2* と似て，神経板周囲を囲い PPE を覆う馬蹄形（U 字型）の発現をもって誘導され，これが神経管形成後に個々のプラコードの発現へと精緻化されていく．そこで，*Xhairy2* 機能阻害が，*dlx5*（st.15）と *six1*（st.18）の発現に与える影響について調べた．Co MO，Xhairy2 MO いずれの微注入でも *dlx5*（Co MO, n = 20; Xhairy2 MO, n = 25，図１７ a, b），*six1*（Co MO, n = 25; Xhairy2 MO, n = 24，図１７ c, d）の発現に影響が見られなかった．この結果は，図１２，図１３で示した *Xhairy2* 機能阻害による形態変化のデータと一貫性を示している．つまり，*dlx5, six1* は LP を除く頭部プラコードで発現するからである（Papalopulu and Kintner 1993; Pandur and Moody 2000）．この結果に基づいて，次に別の PPE 遺伝子である *foxE3*（st.15）と *notch2*（st.15）に関して調べた．この二つは，図１４で示したように，尾芽胚期に PLE や LP を標識し，*Xhairy2* 機能阻害によりその発現に関しては減少が見られた．神経胚期では PPE 様の U 字型発現を示す．図１４で示した結果と一致して，*notch2* の発現は，Xhairy2 MO 微注入により顕著に減少した（減少 70%, n = 24，図１７ f）．Co MO では変化が見られなかった（全て正常，n = 20，図１７ e）．しかし，興味深いことに，*foxE3* の発現に関しては，Co MO, Xhairy2 MO いずれも発現に影響を与えなかった（Co MO, n = 29，図１７ g; Xhairy2 MO, n = 26，図１７ h）．ただし，後期神経胚（st.19）では顕著な減少が見られた（図２３；Co MO: 正常 88%, n = 16, Xhairy2 MO: 減少 70%, n = 20，図示さず）．*zic1* は神経誘導の時期に発現を開始し（Kuo et al. 1998; Mizuseki et al. 1998），概ね *Xhairy2* とオーバーラップするように発現する（図１７i, j）．予備的な実験だが，両者の関係について，それぞれの MO で機能阻害し発現を確認した．Zic1 MO 注入胚では，後期原腸胚において *Xhairy2* の発現に顕著な影響は見られなかった（Zic1 MO, n = 10，図１７l）．また，Xhairy2 MO 注入胚でも，中期神経胚における *zic1* の発現に顕著な影響は見られなかった（Co MO, n = 10; Xhairy2 MO, n = 9，図１７m, n）．これらの結果から，*Xhairy2* がレンズ系譜特異的に必要とされているのか，もしくは，他の PPE 遺伝子とはパラレルに機能していることを示唆している．

４－６　LF における *pax6* の発現消失は細胞周期阻害因子 $p27^{xic1}$ の異所発現により部分的に引き起こされる

ここまでの結果は，*Xhairy2* 機能阻害胚ではレンズ系譜の細胞が，マーカー遺伝子の発現でしか認識できないLF誘導期からすでに影響を受けていることを示している．*Xhairy2*の必要性について，そのメカニズムを説明するために，まずはレンズ系譜の誘導に必要とされるシグナル経路や組織について，その変化を遺伝子発現のレベルで確認した．以前の研究で，*pax6*のLF発現にはFGF8が必要とされることが示唆されていた(Ahrens and Schlosser 2005; ただし，データは示されていない)．しかし，Co MO, Xhairy2 MOいずれもが *fgf8* (Christen and Slack 1997; Co MO, n = 28; Xhairy2 MO, n = 38, 図１９ a, b) , *fgfr4c* (Golub et al. 2000; Co MO, n = 38; Xhairy2 MO, n = 34, 図１９ c, d) の発現に影響を与えなかった．また，頭部内中胚葉がレンズ誘導に必要とされることが報告されていたが (Henry and Grainger 1990)，マーカー遺伝子である *cer* (Piccolo et al. 1999) の発現で確認したところ，Co Mo, Xhairy2 MOのいずれもが影響を与えなかった (Co MO: n = 22, Xhairy2 MO: n = 25, 図１８ a, b)．最後に，底板はHedgehogシグナル経路を中心として眼の形成負に調整している (例えばKondoh et al. 2000; Yamamoto et al. 2004)．*Xhairy2*機能阻害により底板で発現する *shh* の発現が拡大していないか確認したが，Co MO, Xhairy2 MO ともにそういった拡大は見られなかった (Co MO, n = 25; Xhairy2 MO, n = 26, 図１８ c, d)．ちなみに，以前の研究で，底板で *Xhairy2*を機能阻害した場合に *shh* の発現が減少することが示されている (Murato et al. 2007)．合わせて考えると，これらの結果は *Xhairy2*が既知のレンズ誘導メカニズムの外側で機能していることを示唆している．

Xhairy2aとXhairy2bは，他のHes因子と同じように転写抑制因子として機能する(Murato et al. 2006; Murato et al. 2007; 図２０ A)．そこで，原腸胚や初期神経胚の予定LF領域にて本来発現しない遺伝子が *Xhairy2* 機能阻害により異所的に発現誘導されることで，中期神経胚におけるLFの形成が阻害されているのではないかと予想した．神経堤の形成における *Xhairy2*の機能に関する過去の研究で，*Xhairy2*が *Xdelta-1* (Chitnis et al. 1995) や *ngnr-1* (Ma et al. 1996) といった前ニューロン遺伝子の発現を抑えていることが示されていた (Nagatomo and Hashimoto 2007)．本研究の微注入条件でも，こういった一連の遺伝子群の発現上昇が確認された(データ示さず)．加えて，今回新たに前ニューロン遺伝子である *XMyT-1* (Bellefroid et al. 1996) の発現も上昇することが分かった (Xhairy2 MO: 上昇 59%, n = 22; Co MO: 全て正常, n = 20, 図２１ a, b)．

LFと神経堤は互いに独立しているが隣接した領域である．これは神経堤を *foxD3* (Sasai et al. 2001)，LFを *pax6, six3* の染色で可視化すれば明らかである (図２１ g, h)．そこで，LFの形成が，神経堤の形成と同様のメカニズムで *Xhairy2*により制御されているのではないかという仮説を立て，*Xhairy2*機能阻害により異所発現がみられる前ニューロン遺伝子 $p27^{xic1}$ (Ohnuma et al. 1999) に焦点を当てることにした (Co MO: 全て正常, n = 17; Xhairy2 MO: 異所発現 90%, n = 20, 図２１ c, d)．*Xhairy2*機能阻害による $p27^{xic1}$ の異所発現は，神経堤の消失を引き起こすことが以前の研究で明らかになっている (Nagatomo and Hashimoto 2007)．

他の前ニューロン遺伝子については，*Xhairy2* との同時機能阻害で神経堤消失の表現型がレスキューされず，しかも *Xhairy2* と *p27*^{xic1} の同時機能阻害は *Xdelta-1* や *ngnr-1* の発現上昇をレスキューできる（Nagatomo and Hashimoto 2007）．言い換えれば，*Xhairy2* 機能阻害による *p27*^{xic1} 以外の前ニューロン遺伝子の発現上昇は，神経堤や LF 消失とパラレルに起こっているということが推測できる．しかも，*p27*^{xic1} と *pax6* の発現領域を二重染色で慎重に比較すると，後期原腸胚でも中期神経胚でも，これら二つの遺伝子は胚前方部で相補的に発現していることがわかる（図２１ e, f）．発生の後期では，*p27*^{xic1} は分化しつつあるレンズ胞でも発現を開始することから（Ohnuma et al. 1999），発生初期におけるレンズ系譜細胞で *p27*^{xic1} の発現を抑制するメカニズムの一部に *Xhairy2* が組み込まれているかもしれないことが暗示される．

Xhairy2 機能阻害胚における *p27*^{xic1} 異所発現と LF 消失の関係を調べる前に，LF の消失が神経堤消失の二次的影響で引き起こされたものではないことを確認した．この目的のため，野生型の神経堤を Xhairy2 MO 注入胚に移植し（図２１ i），LF 消失の表現型がレスキューされるかどうか確かめた．*foxD3* で標識される野生型の神経堤の移植は *Xhairy2* 機能阻害胚における *pax6* の LF 発現消失をレスキューできなかった（減少 83%, n = 12, 図２１ 1, 1'）．また，弱い *foxD3* の発現で標識される Xhairy2 MO 注入神経堤の移植は，野生型ホストの *pax6* LF 発現に影響を与えなかった（全て正常，n = 5, 図２１ m）．野生型神経堤の Co MO 注入ホストへの移植（全て正常，n =8, 図２１ j），Co MO 注入神経堤の野生型ホストへの移植（全て正常，n = 3, 図２１ k）いずれも *pax6* の LF 発現に影響を与えなかった．これらの結果は，LF 形成における *Xhairy2* の自律的な機能を示唆するものである．

Xhairy2 機能阻害による *p27*^{xic1} 異所発現が LF 形成を阻害しているのか検証するため，最初に *p27*^{xic1} mRNA 20 pg を前述のように微注入した．中期神経胚における *pax6* の発現を WISH により確認したところ，*p27*^{xic1} の過剰発現は LF 発現のみの消失を示し（減少 41%, n = 61, 図２１ n），*Xhairy2* 機能阻害と同様の振る舞いを見せた．さらに，Xhairy2 MO（6.8 ng）と Co MO（3.4 ng）の共注入による *Xhairy2* の機能阻害は *pax6* の LF 発現を減少させ（減少 77%, n = 70, 図２１ p），これは Co MO の代わりに p27 MO（3.5 ng）を共注入することで緩和された（減少 53%, n = 75, 図２１ q）．予想通り，p27 MO（3.5 ng）単独の微注入では *pax6* の LF 発現に顕著な変化は見られなかった（正常 96%, n = 70, 図２１ o）．*six3* の LF 発現については，レスキューの度合いが弱かったことから（データ示さず），こちらの制御については異なる因子が関与していることが想像された．いずれにしても，これらの結果は Xhairy2 による *p27*^{xic1} の早まった発現からの保護が LF の形成ならびに以降のレンズ形成に必要とされることを示唆している．

Xhairy2 機能阻害により，*p27*^{xic1} の異所発現が起こっていることを示す傍証として，細胞増殖の低下とアポトーシスの誘導を挙げることができる．分裂中細胞の抗原にリン酸化ヒストン H3（PHH3）があるが，この抗体染色と *pax6*（st. 15）ないし *foxE3*（st. 19）の WISH を

共役させて，*Xhairy2* 機能阻害による細胞増殖の低下を調べた．その結果，以前の報告（Nagatomo and Hashimoto 2007）と同様に，Xhairy2 MO 注入胚において，st.19 では PHH3 のレベルに顕著な減少が見られたが（図２３ c-d''），面白いことに st.15 では顕著な変化が見られなかった（図２３ a-b''）．ただし，PHH3 はあくまで分裂中細胞の抗原であるにすぎないので，増殖能の増減を調べるには不十分ではある（これについては以降に BrdU のデータを示す）．アポトーシスについては，TUNEL により検証した．こちらも，以前の報告（Nagatomo and Hashimoto 2007）と同様に，Xhairy2 MO 注入胚において，st.18 ではアポトーシスのレベルが顕著に上昇していたが（図２３ e, f），面白いことに st.15 では顕著な変化は見られなかった（図２３ g, h）．これらの結果は，*Xhairy2* 機能阻害胚における *p27*^{xic1} の異所発現の傍証であるとともに，中期神経胚（st.15）でみられる LF の消失が，付近細胞の増殖停止や大量のアポトーシスによるものではないことを暗示していると言える．これについては，Xhairy2 MO 注入胚における *Xhairy2* 自身の発現によっても支持される．即ち，Xhairy2 が属する Hes 因子は自身の転写を負に制御していることが知られているのだが（例えば Davis and Turner 2001），もしこの時期にアポトーシスなどが LF 近傍で生じているならば，WISH を行った際にそのシグナルが大きく消失するはずである．しかし，実際には図２３ j で示すように，st.15 の LF 付近で *Xhairy2* の強い発現上昇が観察される（100%, n = 10; Co MO, 全て正常, n = 11, 図２３ i）．以降では，*p27*^{xic1} に関連して，細胞増殖と LF 形成の関係をより詳細に解析した．

４－７　*Xhairy2* 機能阻害は後期神経胚における LF 内における細胞増殖に影響を与えるが，細胞周期の阻害自体が LF 消失やレンズ形成不全を引き起こしているわけではない

ここまでの結果は，LF 形成における *p27*^{xic1} に対する制御が部分的に必要とされることを示唆している．ここで，*p27*^{xic1} は細胞周期を阻害することが知られていることから（Ohnuma et al. 1999; 図２２），*Xhairy2* による増殖能の制御が LF 形成に関与しているのか厳密に検証した．この目的のために，BrdU 取り込み実験を行い，LF 遺伝子発現の消失が細胞増殖の低下と連動しているのかどうか，中期神経胚と後期神経胚にて検証した．*p27*^{xic1} mRNA, p27 MO, Xhairy2 MO と Co MO, Xhairy2 MO と p27 MO を上述の要領で微注入した．神経胚期に，さらに BrdU を微注入した．LF を可視化するために，BrdU 検出の前に *pax6*（中期神経胚）ないし *foxE3*（後期神経胚）で WISH を行った（図２４）．Xhairy2 MO と Co MO の共注入による *Xhairy2* の機能阻害により，後期神経胚にて *foxE3* で標識される LF 内の BrdU 陽性細胞が減少したが（図２４ g, g', i），これは Co MO の代わりに p27 MO を共注入してもレスキューされなかった（図２４ h, h', i）．LF 内限定とは言え，これは以前の報告と一貫性を示している（Nagatomo and Hashimoto 2007）．しかし，中期神経胚では，*pax6* の LF 発現で標識される LF 内で顕著な BrdU シグナルの低下を見せたのは，*p27*^{xic1} の過剰発現のみであった（図２４ a-d, a'-d', i）．これらの結果は，増殖細胞数の低下という観点で，*Xhairy2* 機能阻害による *p27*^{xic1} の異所発現が

確かにLF系譜細胞で起こっていることを示している．しかし，増殖細胞数の低下それ自体が，少なくとも中期神経胚におけるLF消失を引き起こしているわけではないようである．

上記の結果に基づいて，LF形成と細胞周期制御の関係をさらに検証した．この目的のために，DNA複製を阻害することが知られているhydroxyureaとaphidicolin（以下，HUA）で処理することで，細胞周期を阻害した．HUA処理の効果については，BrdU取り込み実験で確認した（図２５ a-c）．HUA処理がLF遺伝子発現に影響を与えるか調べるために，胚を初期原腸胚期から中期神経胚期までHUAもしくはDMSOにより処理して，*pax6*と*six3*でWISHを行った．この結果，HUA処理を行っても*pax6*のLF発現は正常であったが（85%, n = 20, 図２６ e; DMSO: 正常 95%, n = 20, 図２５ d），*six3*のLF発現については穏やかな減少が見られた（50%, n = 20, 図２５ g; DMSO: 正常 90%, n = 20, 図２６ f）．PPH3レベルはDMSO処理群と比較してHUA処理群で顕著な減少が見られた（n = 10, 図２５ d, e）．また，これらの結果を支持するように，HUA処理を行った胚でレンズが形成された（n = 10, 図２５ i, i'; DMSO: 全て正常，n = 10, 図２５ h, h'）．合わせて考えると，以上の結果は，LF形成に関しては，細胞周期の制御が*Xhairy2*の機能の根底にあるわけではないことを示唆していると言える．

５．考察

５－１　本研究で得られた知見のまとめ

本研究では，*Xhairy2*が頭部感覚器官の形成に持ち得る機能を明らかにすべく，一連の機能阻害実験を行った．*Xhairy2*の機能阻害は，中期神経胚において，*pax6*などの発現で標識されるLFの消失を引き起こした（図１６）．これは以降のレンズ形成にも引き続いて影響を与えた．*Xhairy2*機能阻害胚では，レンズ決定マーカーである*L-maf*ならびに分化マーカーである*γ1-cry*の発現が激減し（図１４），結果としてオタマジャクシ幼生における球状レンズ構造の消失につながったものと推測される（図１３）．重要なことに，網膜系譜のマーカー遺伝子の発現には顕著な変化が見られず（図１４，１５），形態に限って言えば，オタマジャクシ幼生における網膜でも特徴的な層状パターンが維持されていた（図１３）．*Xhairy2*機能阻害胚の眼の表現型は，網膜とレンズの両方が形成不全を引き起こす*Hes1*ノックアウトマウスのそれとは異なっている（Tomita et al. 1996; Lee et al. 2005）．このマウスの事例では，レンズの形成不全は主に網膜形成不全の二次的な影響という考察が為されていたが（Tomita et al. 1996），これは種間の機能の差を示しているのかもしれない．当然，モルフォリノの微注入とノックアウトという方法論の違いによる可能性も否定できない．即ち，本研究ではPPE領域を粗った微注入を行っているので，モルフォリノの神経板への混入は低いレベルに抑えられており，本来具現化すべき網膜の表現型がでなかったという可能性である．しかし，

仮にそうであったとしても，*Xhairy2* がレンズ系譜で非常に早い時期から特異的に必要とされているということを示せていることには変わりなく，従って本研究の知見は十分に意義があるものと思われる．*Xhairy2* が機能する分子機構として，LF を含む PPE における *p27*^{xic1} の発現抑制が示唆された（図２１）．Xhairy2 MO 胚で p27^{xic1} の異所的免疫陽性を確認したわけではないが，*Xhairy2* 機能阻害が p27 MO 微注入により部分的にレスキューされたため，*Xhairy2* 機能阻害の形質を引き起こしているのは *p27*^{xic1} の翻訳産物であることは間違いないだろう．これは，*p27*^{xic1} mRNA 微注入による過剰発現が，*Xhairy2* 機能阻害とよく似た形質を示すことからもさらに支持される（図２１）．しかしながら，p27 MO による Xhairy2 MO の表現型レスキューは完全なものであるとは言いがたい．予備的な実験結果では，st.28 における *L-maf, foxE3* の発現ならびに st.42 での球状レンズ構造は，*Xhairy2-p27*^{xic1} 同時機能阻害でレスキューできなかった（図２８）．これは，Xhairy2 MO 胚における，特に尾芽胚期以降の表現型については，*p27*^{xic1} 以外の因子が関与していることを強く示す結果であると考えられる．ここで，*p27*^{xic1} mRNA の過剰発現は調べた全ての時期での表現型について概ね *Xhairy2* 機能阻害を模し（図２８），さらに p27 MO が Xhairy2 MO による増殖能の低下を全くレスキューできないことから，Cip/Kip ファミリーに属し尚かつ発生過程で発現制御を受けている他の因子の関与を疑うことは，ある程度妥当であると思われる．例えば，近年ツメガエルでクローニングされた *p16Xic2* や *p17Xic3* (Daniels et al. 2004) などについて調べてみるのは面白いかもしれない．また，この問題は，方法論的な限界によって引き起こされている可能性があることも考慮すべきであろう．つまり，Xhairy2 MO-p27 MO 共注入の場合，Xhairy2a MO, Xhairy2b MO, p27 MO の三種類の MO の混合となっているため，発生が進むにつれて，理想的な割合で MO を含む細胞が減少していくことはおそらく間違いないからである．いずれにしても，これらの結果に基づいて，*Xhairy2* は *p27*^{xic1} の発現制御を部分的に通じて，PPE 内におけるレンズ運命にバイアスのかかった LF の形成ないし予定 PPE 領域の形成に必要とされると結論づけられた．

５－２　*Xhairy2* の機能阻害でレンズ性細胞の完全な消失が起こらないのはなぜか：*Xhairy2* と *foxE3, L-maf* の関連について

Xhairy2 機能阻害胚において，レンズの性質をもった細胞の完全な消失はほとんどみられなかった（図１３）．これは，*Xhairy2* による *foxE3* の制御に関連していると考えられる．*foxE3* は，マウスにおいて，レンズ系譜細胞の増殖，分化の両方を制御する重要な遺伝子である (Medina-Martinez et al. 2005)．また，ゼブラフィッシュにおいても，レンズの形態形成に重要な役割を果たしていることが知られている (Shi et al. 2006)．中期神経胚（図１７），後期神経胚（図２４），後期尾芽胚（図１４）における *Xhairy2* 機能阻害と *foxE3* の発現変化から明らかになったことは，*Xhairy2* 機能阻害によっては *foxE3* の中期神経胚における最初の発現には影響がなく，なおかつ尾芽胚期の発現については，発現の完全な消失は起こらず常に *foxE3* 陽性細胞が残っているということである．ツメガエルにおいて，Notch シグナル

は *foxE3* 発現の重要な構成因子であることが報告されているので (Ogino et al. 2008), *foxE3* に関する結果は，*Xhairy2* 機能阻害によって尾芽胚期の *notch2* の発現が消失する割合が 50% 程度であったという事実と一貫性がある（図１４）．これらとは反対に，*Xhairy2* 機能阻害で *L-maf* の発現はほぼ完全な消失を見せた（図１４）．この事実から，*Xhairy2* は *foxE3* とパラレルに機能しており，*γ1-cry* の発現消失と球状レンズ構造の形成不全は，おもに *L-maf* の発現消失によるところが大きかったのではないかと推測される．今後の研究で，*foxE3* と *Xhairy2* の二重機能阻害を行うと面白いかもしれない．

５－３　*Xhairy2* による頭部感覚器官プラコード形成の制御

Xhairy2 の原腸胚における発現パターンから，当初全ての頭部感覚器官の形成に関与していると予測された．しかし，*Xhairy2* の機能阻害は，嗅覚器官ならびに聴覚器官の形成不全を引き起こさなかった（図１２）．神経胚における *pax8* と *foxG1* の発現は特異的に弱く減少したにすぎなかったため，こちらには他の Hes 因子が関与しているのかもしれない．この候補としては，例えば，予定聴覚プラコード領域で神経胚から発現を見せる *XHes2* を挙げることができる (Solter et al. 2006)．予備的な知見ではあるが，少なくとも，*Xhairy2* の機能阻害によって *XHes2* の発現は減少しない（図２９）．加えて，*Xhairy2* の PPE 発現の開始は重要な PPE マーカーである *six1* と *dlx5* よりも早いにもかかわらず,*Xhairy2* の機能阻害は，これらの発現に影響を与えなかった（図１７）．マウスでは，*Six1* のノックアウトにより，LP を除く非神経プラコード，神経プラコードの両方の形成が阻害されると報告されている (Zou et al. 2004)．こういったことを合わせて考えると，*Xhairy2* は，プラコード形成の観点から，LP の形成特異的に機能しているのかもしれない．他の *Hes* 因子の同定ならびにそれらと *Xhairy2* の多重機能阻害が，この問題の理解を深めるものと考えられる．

５－４　*Xhairy2* の機能と PPE の性質の関係：Xhairy2 が存在することで PPE はどういった状態にあるのか

レンズ系譜の細胞では，多くの転写因子が順に活性化される (Ogino and Yasuda 2000; Kondoh 2008)．レンズ形成における重要性を理解する上で，*Xhairy2* をこの種のカスケードの最上流因子として位置づけることが可能である．*Xhairy2* の機能阻害は *pax6* や *six3* の LF 発現を減少させたため，これらより上位にあると考えることができる．逆に，*Xhairy2* の過剰発現がこれらの遺伝子の LF 発現を拡大させるはずである．しかし，実際にはそういったことは起こらなかった（図２０）．しかも，*Xhairy2* の機能阻害は *fgf8* や *fgfr4c* の発現に影響を与えなかった（図１９）．ツメガエルにおいて，FGF シグナルは PPE の *pax* や *six1* の発現に必要とされることが報告されている (Ahrens and Schlosser 2005)．これは Xhairy2 がなくとも，予定 LF 近傍のシグナル環境は正常である可能性を示唆している．含わせて考えると，*Xhairy2* はシグナルの入力から開始されるレンズ形成特異的な転写因子カスケードの外側で

機能しているのかもしれない．

分化マーカーである *n-tubullin* の発現から見ると，三叉神経節プラコードを除いて，ほとんどの頭部プラコード細胞は神経管形成後に分化を開始する．ただし，各プラコードの予定領域を特異的に標識する遺伝子の発現が神経板期から開始されるという事実から，多くの頭部プラコードに分化できるポテンシャルをもった PPE 細胞は，本質的に分化に対して誘導的な環境の中にあって積極的に未分化な状態を維持する必要があることが想像できる．例えば，この考えは，ツメガエルでは，*ngnr-1* の発現が原腸胚期に一過的に PPE で見られ，その後すぐに三叉神経節プラコード以外の領域で抑制されるということからも部分的に支持される (Schlosser and Ahrens 2004)．*Xhairy2* の機能阻害胚では，一過的に，*ngnr-1, X-delta-1, X-MyT1* といった前ニューロン性の遺伝子の発現が上昇する (Nagatomo and Hashimoto 2007, 本研究)．よって，*Xhairy2* の PPE における重要な機能の一つは積極的な未分化状態の維持であると考えられる．

PPE の状態に関係する *Xhairy2* の機能を理解するもう一つの手がかりが，*Xhairy2* 機能阻害で見られる *p27*^{xic1} の異所発現である (Nagatomo and Hashimoto 2007, 図２１)．これは，*Xhairy2* と *p27*^{xic1} の二重機能阻害は前ニューロン遺伝子の発現上昇や (Nagatomo and Hashimoto 2007) *pax6* の LF 発現消失をレスキューしたためである (図２１)．p27^{xic1} は，CDK 阻害因子である Cip/ Kip ファミリーに属し，cyclinE/ CDK2 複合体に結合して CDK2 のリン酸化酵素活性を阻害して G1/S 期の移行を阻止する (Besson et al. 2008 が参考になる，図２２)．こういった因子の発現は，分化しつつある細胞に共通してみられる特徴の一つである．この分子機構を反映してか，*p27*^{xic1} は，分化しつつあるレンズ上皮細胞で発現している (Ohnuma et al. 1999)．こういった事実は，不完全とは言え，*Xhairy2* 機能阻害胚で *foxE3* の発現が減少することと矛盾しない．これは，ツメガエル，ゼブラフィッシュ，マウスの研究で，*foxE3* が未分化状態を正に制御しているという報告があるからである (Kenyon et al. 1999; Medina-Martinez et al. 2005; Shi et al. 2006)．さて，*Xhairy2* 機能阻害により，後期神経胚において分裂中の細胞が減少することが報告されている (Nagatomo and Hashimoto 2007)．本研究では，WISH 共役の BrdU 取り込み実験により，この減少が *foxE3* で標識される LF 内で確かに起こっていることを示した (図２４)．*Xhairy2* はレンズ特異的な転写因子カスケードの外側に位置することが示唆されているため，この結果は，*Xhairy2* が遺伝子発現の制御には何ら影響を与えずに，レンズ系譜細胞の数にだけ影響を与えているという可能性も考えられた．しかし，LF 消失が最初に見られる中期神経胚では，分裂中の細胞数に変化は見られず (図２３)，BrdU 取り込み実験によっても，顕著な増殖能の低下もこの時期起こっていない (図２４)．さらに，HUA 処理によって強制的に細胞周期を阻害しても，*pax6* の LF 発現やレンズの形成に顕著な影響は見られなかった (図２５)．これらの結果は，*Xhairy2* が細胞周期の制御とは関係なく LF 形成に機能していることを示唆しているのかもしれない．興味深いことに，p27^{xic1} の機能は二つに分けられることが報告されている：細胞周期の制御と分化の制御である (Vernon et al.

2003; Vernon and Philpott 2003). 例えば，p27^{xic1}の様々な短縮変異体を過剰発現させた研究では，ツメガエルの網膜や分化中の一次ニューロンにおいて，p27^{xic1}のN端の一部が，細胞周期の制御とは独立して直接的に分化を誘導する活性を有することが示されている (Ohnuma et al. 1999; Vernon et al. 2003). 予備的な実験ではあるが，神経堤とLFの形成に関して，これと符合する結果が得られている（図２６，図２７）．もしかすると，*Xhairy2*による*p27^{xic1}*の発現抑制は，分化を阻害するためのものであるのかもしれない．より理解を深めるためには，p27^{xic1}の分子的な性質を明らかにする必要があるだろう．特に，p27^{xic1}のN端の構造を介したタンパク間相互作用の解明が重要かもしれない．

以上を合わせて考えると，*Xhairy2*は，PPE細胞でシグナル経路や遺伝子発現制御が適切に行われるために，未分化状態の維持を中心とした適切な環境づくりに必要とされるのではないかと考えられる．これにより，レンズ系譜となるべき細胞がコンピテントになっているのではないか．興味深いことに，多能性細胞の集団である前方部脊索前板や神経堤の形成における*Xhairy2*の機能解析でも，*Xhairy2*が組織性質の維持や未分化状態の維持に必要とされることが報告されている (Yamaguti et al. 2005; Nagatomo and Hashimoto 2007). レンズコンピテンスは，レンズ形成の土台となる状態であると概念的に定義されているが (Henry and Grainger 1987)，未だその分子的な性質は不明である．Xhairy2の存在が，まさにこの土台の一部なのではないだろうか．この点に関して，次項で展開的に議論する．

５－５：総合議論

誘導と応答は，発生現象のメカニズムとして今や広く認知されている．Spemannが，両生類のレンズ形成過程の解析から見いだしたことも関係してか，レンズ形成の研究では，今日でも尚，誘導と応答機構の解明はその中心的な命題であり続けている．特に，３０年前まだ概念的なレベルで語られていたにすぎない「誘導物質」なるものが，遺伝子レベルでの解析が行われるようになって以来，なんらかの遺伝子産物という現実的な存在に様変わりした．この認識の変化にともない，誘導と応答のメカニズム解明は，シグナル経路のリガンドとレセプターの同定という研究課題と同義になっている．仮に，Crystallinの発現をもってレンズ前駆細胞の分化完了と考えるならば，転写因子カスケードを遡り，そのインプットとなるべきシグナル経路を同定することは可能である．一般的に，レセプターの発現は一帯の組織一様に見られることが多いため，この文脈では応答の生物学的意義にそれほどの注目が集まることはないだろう．

しかし，本研究で示唆された*Xhairy2*の機能を考えると，応答能の意味と意義を再考せざるを得ない．*Xhairy2*はその発現パターンから，応答する側の細胞の系譜で発現していると推測される．レンズ誘導において誘導源と考えられている網膜系譜の遺伝子発現には，*Xhairy2*機能阻害の影響がでないことがこの推測をさらに後押しする．しかも，現在ツメガエルにおいてレンズ誘導（LF誘導）シグナルの最有力候補であるFGFシグナル経路を構成す

る因子 *Fgf8* や *Fgfr4c* の発現には変化が見られなかった．つまり単純に考えれば，リガンドとレセプターは存在していることになる．レセプターの存在が即ち応答できる能力，応答能の定義全てならば，これは大きな矛盾となる．それでも尚，*Xhairy2* を機能阻害して LF が誘導されないという事実と向き合った場合に，応答能について新たに重要な要素を付け加えざるを得ない．それは未分化である状態，未分化性である．一見すると言葉遊びに思われるかもしれないが，分化すべき細胞はまず未分化でなければならない．幹細胞，あるいは，染色体 DNA の修飾状況に関する研究から明らかになってきたことをまとめてみると，第一段階の組織前駆細胞の分裂が最も活発で，以降，細胞は分化が進めば進むほど分裂しにくくなる．おそらくこれは，分化が進むごとにゲノムに付加される DNA 修飾やヒストン修飾などの高次元な情報を，完全に複製するのに極めて多くのコストが必要とされるからであろう．分化する前に十分に分裂するということは，胚発生における必須事項であると言っても過言ではない．分化と増殖のスイッチングがどのようなシステムによって為されているのか不明な点は多いが，二律背反の性質を考慮すれば多機能性の単一種分子が文字通りスイッチになっている可能性が高い．この側面に注目すれば，*Xhairy2* によって制御されている *p27*^{xic1} のような細胞周期阻害因子の重要性がよく理解できよう．全ての Cip/Kip ファミリー因子に当てはまる訳ではないようだが，少なくとも p27^{xic1} は細胞周期阻害活性とは独立して分化誘導活性を有することが報告されており (Vernon et al. 2003)，それぞれ別のドメインによって担われている．まとめると，前章で議論した，*Xhairy2* が *p27*^{xic1} を抑制することで得られる未分化性の維持は，まさにこの応答能の実体の一部であると言える．序論で紹介したが，Hes 因子と応答能の関係について，昨年興味深い報告がなされた．未分化細胞のうち，一時的に増殖を停止しているが刺激を受ければ増殖を再開できる細胞は静止細胞 Quiescent cells と呼ばれ，例えば成体における組織幹細胞がこれに含まれる．こういった細胞では Cip/Kip ファミリー因子 (p21^{cip1} など) が機能することで細胞周期が停止しており，静止状態を脱して増殖を再開する際にはこういった因子が細胞から消失する．静止状態の制御は Cip/Kip 因子の有無に依存する受動的な過程であると考えられていたが，Sang らは，静止状態の線維芽細胞で Hes1 をノックアウトすると，人為的に Cip/Kip 因子を細胞から除外した上で血清添加による刺激を与えても増殖が再開されず恒久的に停止することを見いだした (Sang et al. 2008)．これは，Hes1 を導入することでレスキューされる．以前から，芽細胞のような未分化細胞で分化を抑制する実体として Hes1 が存在していることは明らかになっていたが，これに加えて Sang らが提出した証拠は，Hes1 がまさに応答能を保障しているということを示している．

PPE は全能性幹細胞ではないが，それに近い性質を持っているはずである．ではこういった性質は胚発生のいつどのように獲得されたのだろうか．この問題は核心的だが，現時点ではこれに直接答えられるデータはない．以下，手持ちのデータを元に仮説を提案したい．ヒントは，*Xhairy2* の時空間的発現パターンにあると考えられる．*Xhairy2* の mRNA は，そもそも卵に母性因子として存在している (Murato et al. 2007)．後期胞胚—初期原腸胚期で WISH

を行うと，弱いながらも予定外胚葉領域全域でシグナルが検出される(Tsuji et al. 2003)．しかし，神経誘導が起こった直後から，表皮としての運命を受けた領域（腹側）と神経としての運命を受けた領域（背側）で発現が消失する．表皮領域と神経領域の境界であるPPEは，即ち，最初から存在する発現が残った領域であると言える．この領域では，その後染色体からの新規発現により発現レベルの増強が見られる．ここで，予定外胚葉領域は，どういった領域だろうか．端的に言えば，未分化で多能性の細胞の集団からなる領域である．なぜなら，表皮，神経，神経堤，プラコードの全てが生じるからである．さらに，幹細胞様の性質として増殖能をあげることができる．実際，*Xhairy2*を機能阻害すると，後期神経胚で強い増殖低下が見られた（ただし，これは $p27^{xic1}$ の異所発現によるものではない；Nagatomo and Hashimoto 2007)．つまり，*Xhairy2*の発現は未分化性と増殖能が具現化されたものであると言える．ここに，先に述べた*Xhairy2*と $p27^{xic1}$ の関係が集約してくる．

こういった応答能の保障は，*Xhairy2*だけによってなされている訳ではない．キーとなる遺伝子ファミリーが，zicとfoxファミリーである．Zicは，ショウジョウバエで単離されたpair-rule遺伝子*odd paired*のホモログである．脊椎動物にいたる過程で重複が見られ，5つのzicが存在している．このうち，例えばzic1やzic2は，ゼブラフィッシュ胚やツメガエル胚において，神経誘導の結果として神経領域で発現を開始し，その後PPEを含む境界領域で強い発現を示す(Kuo et al. 1998; Mizuseki et al. 1998; Grinblat and Sive 2001)．その後は，主に神経堤やプラコード，神経管の背側部位で発現が維持される．脊椎動物で解析が始まった当初は，その早い発現開始時期と前脳領域を含む発現パターン，そして，ノックアウトマウスで見られる終脳の形成不全から(Warr et al. 2008)，中枢神経系の前後パターン決定に関わっていると考えられていた．しかし，特にツメガエル胚での過剰発現のデータがはっきりしないことから，実際の機能はこれとは異なることが示唆されていた．近年，遺伝子発現プロファイリングから，Zic3がES細胞の多能性維持に必要とされることが明らかになってきた（Lim et al. 2007)．これを裏付けるように，マウス胚の内部細胞塊（ICM)がZic2免疫陽性であることが示された(Brown and Brown 2008)．マウスでは，魚類や両生類の胚で見られたような，zicの原腸胚での発現が確認されていなかったため，情報が錯綜していたと言えるが，これらの結果を踏まえて考えると，zicもhes同様に全（多）能性細胞で必要とされる性質を担っていることがうかがえる．ノックアウトマウスで終脳に異常が見られたのは，脳の発生の過程で終脳前駆細胞が最も長い期間未分化状態を維持したまま増殖を続けているからであると推測できる．加えて，成体の脳でも，sub-ventricular zoneなどの神経幹細胞がZic2免疫陽性であることから（Brown and Brown 2008)，いくつかのzicは発生が進んでも限られた組織の幹細胞で発現していると推測できる．Zicについてまとめると，*Xhairy2*と似て初期胚から広い領域で発現し，未分化性と増殖能の維持とに関与しているということになる．ツメガエル胚では，zic1が初期原腸胚期から非常に強い発現を見せ，しかも*Xhairy2*と重なるように発現している（図１７)．それぞれを機能阻害して発現を確認

しても顕著な差が見られないことから（図１７），*Xhairy2* と *zic1* はパラレルに機能することで，ある種のセーフティーネットを構築していると考えられる．

Fox (fork head/ winged helix もしくは fork head box)ファミリー遺伝子は，ショウジョウバエで単離された *fork head* のホモログである．これらは fork head box と呼ばれる進化的に保存された DNA 結合ドメインにより同定される．調べられた限り全ての後世動物で見つかっており，真菌類でも単離されている (Pohl and Knochel 2005)．前の章で，*foxE3* について議論したが，fox ファミリー遺伝子も hes ファミリー遺伝子や zic ファミリー遺伝子と良く似た機能を持っている．ツメガエル胚での fox の解析は，過剰発現によるものが多いので信頼性を欠く部分も多いが，異なる fox において，分化を抑制し細胞増殖を促すという傾向が見られる．たとえば，神経堤における foxD3 (Pohl and Knochel 2001)，レンズにおける foxE3 (Kenyon et al. 1999)，終脳における foxG1 (Xuan et al. 1995; Hanashima et al. 2004) を挙げることが出来る．ただし，一般的に発生の早初期に広い発現を見せる zic や hes とは異なり，fox ファミリーの多くの因子が，原腸胚期以降に組織特異的な発現する．付け加えると，最終分化に至った細胞では発現が消失することから，組織前駆細胞で発現するという表現が正しい．

さて，hes, zic, fox ファミリーを比較してみると，胚発生における役割の類似性に気がつくであろう．例外はもちろんあるが，概して未分化性と増殖能の維持に集約する．ファミリー遺伝子の差を生み出しているのは発現時期と発現領域であり，これにより整理し直してみると，早初期から広い領域で発現する（あるいは母性因子として存在する）hes/zic から，それより遅れて組織特異的に発現する fox へのリレー機構が浮き彫りになる．逆に，役割に注目して考えれば，各組織が最終分化を遂げるまで，ほぼ全ての領域で全ての時期，hes, zic, fox のどれか（或は組み合わせ）で未分化性と増殖能が維持されていることになる．これらファミリー遺伝子はコピー遺伝子を多く有するが，これだけのカバー力を考えれば，まさに数の利が活かされた結果であろう．

脊椎動物の胚の特徴の一つに，細胞数の多さを挙げることが出来る．例えばツメガエル胚では，原腸胚の細胞数は既に万単位であり，その後さらに増加を続ける．そして，原腸形成運動による三胚葉形成を皮切りに，細胞集団の移動や配置換えなどによる複雑な形態形成運動が細胞増殖と同時進行で次々と起こる．細胞の最終分化が例外的に早く起こる組織もあるが (e.g. 三叉神経節ニューロンの一部は，後期神経胚期に分化マーカーの n-tubulin を発現する)，ほとんどの場合は，形態形成に足並みを合わせるように長い期間組織前駆細胞の状態を維持している．全て落ち着いてからそれぞれ特殊に分化するほうが，かたちづくりの微調整が行いやすく，また数を後から確保することが難しいからであると推測できる．いずれにしても，最初の運命決定を受けてから分化に至るまでのタイムラグを解決しているのが，hes/zic/fox 遺伝子群であろう．未分化性と増殖能の維持による応答能の保障とは，なんとも地味な役割であるが，確実に必要とされることは間違いない．このことを鑑みれば，脊椎

動物を脊椎動物足らしめる遺伝子群は，hes/zic/fox のようなものではないだろうか．旧約聖書の一節を引用し，本論文を締めくくりたい．

見張りの者よ，夜の何どきか
見張りの者よ，夜の何どきか
見張りの者は答える
朝は来る，だがまだ夜だ
もし尋ねたければまた来て
尋ねるがよい　　イザヤ書２１章，１１，１２節

６．引用文献

Ahrens K, Schlosser G (2005) Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in Xenopus laevis. Dev Biol 288:40-59

Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X, Gruss P (2000) Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. Genes Dev 14:2701-2711

Bailey AP, Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M, Streit A (2006) Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. Dev Cell 11:505-517

Bellefroid EJ, Bourguignon C, Hollemann T, Ma Q, Anderson DJ, Kintner C, Pieler T (1996) X-MyT1, a Xenopus C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. Cell 87:1191-1202

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Dev Cell 14:159-169

Brown L, Brown S (2008) Zic2 is expressed in pluripotent cells in the blastocyst and adult brain expression overlaps with makers of neurogenesis. Gene Expr Patterns

Brownell I, Dirksen M, Jamrich M (2000) Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. Genesis 27:81-93

Chitnis A, Henrique D, Lewis J, Ish-Horowicz D, Kintner C (1995) Primary neurogenesis in Xenopus embryos regulated by a homologue of the Drosophila neurogenic gene

Delta. Nature 375:761-766

Christen B, Slack JM (1997) FGF-8 is associated with anteroposterior patterning and limb regeneration in Xenopus. Dev Biol 192:455-466

Dale KJ, Pourquie O (2000) A clock-work somite. Bioessays 22:72-83

Daniels M, Dhokia V, Richard-Parpaillon L, Ohnuma S (2004) Identification of Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. Gene 342:41-47

Davis RL, Turner DL (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. Oncogene 20:8342-8357

Drysdale TA, Elinson RP (1992) Cell migration and induction in the development of the surface ectodermal pattern of Xenopus laevis tadpole. Dev Growth Differ 34:51-59

Dudley AT, Robertson EJ (1997) Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. Dev Dyn 208:349-362

Faber SC, Dimanlig P, Makarenkova HP, Shirke S, Ko K, Lang RA (2001) Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. Development 128:4425-4438

Fisher A, Caudy M (1998) The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. Bioessays 20:298-306

Fujiwara M, Uchida T, Osumi-Yamashita N, Eto K (1994) Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. Differentiation 57:31-38

Furuta Y, Hogan BL (1998) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. Genes Dev 12:3764-3775

Golub R, Adelman Z, Clementi J, Weiss R, Bonasera J, Servetnick M (2000) Evolutionarily conserved and divergent expression of members of the FGF receptor family among vertebrate embryos, as revealed by FGFR expression patterns in Xenopus. Dev Genes Evol 210:345-357

Grainger RM (1992) Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. Trends Genet 8:349-355

Grainger RM (1996) New perspective on embryonic lens induction. Semin Cell Dev Biol 7:149-155

Grinblat Y, Sive H (2001) zic Gene expression marks anteroposterior pattern in the presumptive neurectoderm of the zebrafish gastrula. Dev Dyn 222:688-693

Grindley JC, Davidson DR, Hill RE (1995) The role of Pax-6 in eye and nasal development. Development 121:1433-1442

Hamburger V (1988) The Heritage of Experimental Embryology. Oxford University Press, New York

Hanashima C, Li SC, Shen L, Lai E, Fishell G (2004) Foxg1 suppresses early cortical cell fate. Science 303:56-59

Hardcastle Z, Papalopulu N (2000) Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. Development 127:1303-1314

Heller N, Brandli AW (1999) Xenopus Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. Dev Genet 24:208-219

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

Henry JJ, Grainger RM (1990) Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in Xenopus laevis. Dev Biol 141:149-163

Hensey C, Gautier J (1998) Programmed cell death during Xenopus development: a spatio-temporal analysis. Dev Biol 203:36-48

Hirsch N, Harris WA (1997) Xenopus Pax-6 and retinal development. J Neurobiol 32:45-61

Hollemann T, Pieler T (1999) Xpitx-1: a homeobox gene expressed during pituitary and cement gland formation of Xenopus embryos. Mech Dev 88:249-252

Holtfreter J, Hamburger V. 1955. Amphibians. In: Willier BH, Weiss PA, Hamburger V, editors. Analysis of Development. Philadelphia: W. B. Saunders. pp 230-296.

Ishibashi S, Yasuda K (2001) Distinct roles of maf genes during Xenopus lens development. Mech Dev 101:155-166

Jacobson AG, Sater AK (1988) Features of embryonic induction. Development 104:341-359

Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2008) Roles of Hes genes in neural development. Dev Growth Differ 50 Suppl 1:S97-103

Kenyon KL, Moody SA, Jamrich M (1999) A novel fork head gene mediates early steps during Xenopus lens formation. Development 126:5107-5116

Kleinjan DA, Seawright A, Schedl A, Quinlan RA, Danes S, van Heyningen V (2001) Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. Hum Mol Genet 10:2049-2059

Kondoh H (2008) Shedding light on developmental gene regulation through the lens. Dev Growth Differ 50 Suppl 1:S57-69

Kondoh H, Uchikawa M, Yoda H, Takeda H, Furutani-Seiki M, Karlstrom RO (2000) Zebrafish

mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohypophysis anlage. Mech Dev 96:165-174

Kuo JS, Patel M, Gamse J, Merzdorf C, Liu X, Apekin V, Sive H (1998) Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in Xenopus. Development 125:2867-2882

Lang RA (2004) Pathways regulating lens induction in the mouse. Int J Dev Biol 48:783-791

Lee HY, Wroblewski E, Philips GT, Stair CN, Conley K, Reedy M, Mastick GS, Brown NL (2005) Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation. Dev Biol 284:464-478

Leger S, Brand M (2002) Fgf8 and Fgf3 are required for zebrafish ear placode induction, maintenance and inner ear patterning. Mech Dev 119:91-108

Leve C, Gajewski M, Rohr KB, Tautz D (2001) Homologues of c-hairy1 (her9) and lunatic fringe in zebrafish are expressed in the developing central nervous system, but not in the presomitic mesoderm. Dev Genes Evol 211:493-500

Li H, Tierney C, Wen L, Wu JY, Rao Y (1997) A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. Development 124:603-615

Lim LS, Loh YH, Zhang W, Li Y, Chen X, Wang Y, Bakre M, Ng HH, Stanton LW (2007) Zic3 is required for maintenance of pluripotency in embryonic stem cells. Mol Biol Cell 18:1348-1358

Loosli F, Staub W, Finger-Baier KC, Ober EA, Verkade H, Wittbrodt J, Baier H (2003) Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3. EMBO Rep 4:894-899

Luo T, Matsuo-Takasaki M, Sargent TD (2001) Distinct roles for Distal-less genes Dlx3 and Dlx5 in regulating ectodermal development in Xenopus. Mol Reprod Dev 60:331-337

Ma Q, Kintner C, Anderson DJ (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. Cell 87:43-52

Mathers PH, Grinberg A, Mahon KA, Jamrich M (1997) The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. Nature 387:603-607

Medina-Martinez O, Brownell I, Amaya-Manzanares F, Hu Q, Behringer RR, Jamrich M (2005) Severe defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice. Mol Cell Biol 25:8854-8863

Mizuno N, Mochii M, Takagi C, Takahashi TC, Eguchi G, Okada TS (1998) A critical role for the optic vesicle in lens development; a reinvestigation of free lens formation in Cynops pyrrhogaster. Differentiation 63:247-252

Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y (1998) Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. Development 125:579-587

Murato Y, Nagatomo K, Yamaguti M, Hashimoto C (2007) Two alloalleles of Xenopus laevis hairy2 gene--evolution of duplicated gene function from a developmental perspective. Dev Genes Evol 217:665-673

Murato Y, Yamaguti M, Katamura M, Cho KW, Hashimoto C (2006) Two modes of action by which Xenopus hairy2b establishes tissue demarcation in the Spemann-Mangold organizer. Int J Dev Biol 50:463-471

Nagatomo K, Hashimoto C (2007) Xenopus hairy2 functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. Dev Dyn 236:1475-1483

Nichane M, de Croze N, Ren X, Souopgui J, Monsoro-Burq AH, Bellefroid EJ (2008) Hairy2-Id3 interactions play an essential role in Xenopus neural crest progenitor specification. Dev Biol

Nieuwkoop PD, Faber J (1967) Normal table of Xenopus laevis (Daudin). North-Holland Pub. Co., Amsterdam

Offield MF, Hirsch N, Grainger RM (2000) The development of Xenopus tropicalis transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. Development 127:1789-1797

Ogino H, Fisher M, Grainger RM (2008) Convergence of a head-field selector Otx2 and Notch signaling: a mechanism for lens specification. Development 135:249-258

Ogino H, Yasuda K (1998) Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. Science 280:115-118

Ogino H, Yasuda K (2000) Sequential activation of transcription factors in lens induction. Dev Growth Differ 42:437-448

Ohnuma S, Philpott A, Wang K, Holt CE, Harris WA (1999) p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in Xenopus retina. Cell 99:499-510

Ormestad M, Blixt A, Churchill A, Martinsson T, Enerback S, Carlsson P (2002) Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1350-1357

Pandur PD, Moody SA (2000) Xenopus Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines. Mech Dev 96:253-257

Papalopulu N, Kintner C (1993) Xenopus Distal-less related homeobox genes are expressed in the developing forebrain and are induced by planar signals. Development 117:961-975

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. Nature 397:707-710

Pohl BS, Knochel W (2001) Overexpression of the transcriptional repressor FoxD3 prevents neural crest formation in Xenopus embryos. Mech Dev 103:93-106

Pohl BS, Knochel W (2005) Of Fox and Frogs: Fox (fork head/winged helix) transcription factors in Xenopus development. Gene 344:21-32

Richardson MK (1995) Heterochrony and the phylotypic period. Dev Biol 172:412-421

Richardson MK (1999) Vertebrate evolution: the developmental origins of adult variation. Bioessays 21:604-613

Rowan S, Conley KW, Le TT, Donner AL, Maas RL, Brown NL (2008) Notch signaling regulates growth and differentiation in the mammalian lens. Dev Biol 321:111-122

Saint-Germain N, Lee YH, Zhang Y, Sargent TD, Saint-Jeannet JP (2004) Specification of the otic placode depends on Sox9 function in Xenopus. Development 131:1755-1763

Sang L, Coller HA, Roberts JM (2008) Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. Science 321:1095-1100

Sasai N, Mizuseki K, Sasai Y (2001) Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in Xenopus. Development 128:2525-2536

Sato T, Sasai N, Sasai Y (2005) Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in Xenopus ectoderm. Development 132:2355-2363

Schlosser G (2006) Induction and specification of cranial placodes. Dev Biol 294:303-351

Schlosser G (2008) Do vertebrate neural crest and cranial placodes have a common evolutionary origin? Bioessays 30:659-672

Schlosser G, Ahrens K (2004) Molecular anatomy of placode development in Xenopus laevis. Dev Biol 271:439-466

Schlosser G, Northcutt RG (2000) Development of neurogenic placodes in Xenopus laevis. J Comp Neurol 418:121-146

Servetnick M, Grainger RM (1991) Changes in neural and lens competence in Xenopus ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer. Development 112:177-188

Shi X, Luo Y, Howley S, Dzialo A, Foley S, Hyde DR, Vihtelic TS (2006) Zebrafish foxe3: roles in ocular lens morphogenesis through interaction with pitx3. Mech Dev 123:761-782

Sive H, Bradley L (1996) A sticky problem: the Xenopus cement gland as a paradigm for anteroposterior patterning. Dev Dyn 205:265-280

Solter M, Locker M, Boy S, Taelman V, Bellefroid EJ, Perron M, Pieler T (2006) Characterization and function of the bHLH-O protein XHes2: insight into the mechanisms controlling retinal cell fate decision. Development 133:4097-4108

Streit A (2004) Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. Dev Biol 276:1-15

Tahara Y (1962) Formation of the independent lens in Japanese amphibians. Embryologia 7:127-149

Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, Ang SL, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1996) Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. Neuron 16:723-734

Tsuji S, Cho KW, Hashimoto C (2003) Expression pattern of a basic helix-loop-helix transcription factor Xhairy2b during Xenopus laevis development. Dev Genes Evol 213:407-411

Vernon AE, Devine C, Philpott A (2003) The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in Xenopus. Development 130:85-92

Vernon AE, Philpott A (2003) A single cdk inhibitor, p27Xic1, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in Xenopus. Development 130:71-83

Warr N, Powles-Glover N, Chappell A, Robson J, Norris D, Arkell RM (2008) Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. Hum Mol Genet 17:2986-2996

Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, Dudley AT, Robertson EJ, Maas R (1999) BMP7 acts in murine lens placode development. Dev Biol 207:176-188

Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC, Lai E (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. Neuron 14:1141-1152

Yamaguti M, Cho KW, Hashimoto C (2005) Xenopus hairy2b specifies anterior prechordal mesoderm identity within Spemann's organizer. Dev Dyn 234:102-113

Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR (2004) Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. Nature 431:844-847

Zhou X, Hollemann T, Pieler T, Gruss P (2000) Cloning and expression of xSix3, the Xenopus homologue of murine Six3. Mech Dev 91:327-330

Zou D, Silvius D, Fritzsch B, Xu PX (2004) Eya1 and Six1 are essential for early steps

of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. Development 131:5561-5572

Zygar CA, Cook TL, Grainger RM, Jr. (1998) Gene activation during early stages of lens induction in Xenopus. Development 125:3509-3519

７．謝辞

本研究は，私が大学院に在籍した５年間全てを使い切って為されたものではありません．それにもかかわらず，いやだからこそ，驚くほど多くの方々の有象無象のお助けがあって，ようやく存在することができたのだと思います．私の記憶力と筆力の問題により，全ての方々にこの場で御礼申し上げることができないことを，お詫び致します．

--

橋本主税先生には，修士課程一年の頃より，足掛け五年の長きに渡って基礎の基礎から指導して頂きました．「論文をたくさん読むのええことやけど，他人の後追いになったらいかん」というご助言は，これからの人生においても私にとって重要な指針になると思います．さらに，ご教示は研究だけに止まるものではなかったように思います．私の拙い思考能力と，良いとは言えない性格のおかげで，当初理解できなかったことがたくさんありました．しかし，五年経った今，ようやく色々なことが分かりつつあります．それが故に，じわじわと真綿で首を絞めつけられるような思いになることもあります．ただ，私はこの場で贖罪をしたいわけではありません．そんなことをしても，いつものようにニヤッと笑って「アホか」とおっしゃるだけだと思います．
これまでの五年間，本当に，ありがとうございました．

宮田隆先生と西田宏記先生には，修士論文と博士論文の両方の審査で，主査，副査をして頂きました．この場をお借りして，改めて御礼申し上げます．ありがとうございました．

萩野肇先生には，γ1-crystallin のプラスミドと抗体を，快く譲って頂きました．どちらも，本研究には欠かせなかった存在です．ありがとうございました．

岡哲也さんは，*dlx5, MyT1, bmp7* をサブクローニングして下さいました．とくに *dlx5* と *MyT1* は投稿論文のほうでも役立ちました．ありがとうございました．

皐裕美さん，永友寛一郎さん，阿草耕介さん，山口真未さん，川辺実季さん，辻咲織さん．研究室でほぼ常になにかとお世話になりました．いつも身勝手な私に愛想をつかさず，援助

の手を差し伸べて下さったことに，感謝しています．ありがとうございました．

最後に，大学院で分野を変えて勉強したいという私の大胆かつ無謀な行為を，最後まで援助して見守ってくれた家族のみんなに，今までありがとう．

８．図と図の解説

図１．脊椎動物の頭部の大部分は，プラコードと神経堤に由来する．

図２．ツメガエル胚における頭部素材の原基的な配置．

図３．A. Jacobson による両生類胚を用いた回転実験．

図４．プラコードの配置とそれを標識する遺伝子発現．

図５．ツメガエル胚における眼の形態形成．

図６．レンズ形成における網膜系譜の必要性を検証するための実験．

図７．網膜原基の切除ないし破壊ないし網膜原基不在の変異体がレンズ形成に与える影響．

図８．R. M. Grainger が１９９２年に提唱したレンズ形成の Stepwise dtermination model の概要を模式図で表したもの．

図９．*Xhairy2* と *dlx5* の発現パターン比較．

図９－２．*Xhairy2* の神経胚と尾芽胚における発現パターン．

図１０．ツメガエル Xhairy2 のオーソログであると考えられるゼブラフィッシュ her9 とマウス Hes1 との比較．

図１１．*Xhairy2* の機能阻害に用いた二種類のモルフォリノ．

図１２．*Xhairy2* の機能阻害は聴覚器官と嗅覚器官の形成にほとんど影響を与えない．

図１３．*Xhairy2* 機能阻害により，レンズ形成不全が生じる．

図１３－２．Co MO を Xhairy2 MO と同じ量で微注入しても眼の発生に影響は見られない．

図１４．*Xhairy2* 機能阻害は，尾芽胚期におけるレンズ系譜遺伝子の発現を減少させるが，網膜系譜遺伝子の発現には影響しない．

図１５．中期神経胚における LF の遺伝子発現

図１６．*Xhairy2* 機能阻害は中期神経胚における LF マーカー遺伝子の発現を減少させる．

図１７．*Xhairy2* 機能阻害は神経胚における前プラコードマーカー遺伝子の発現にあまり影響を与えない．

図１８．*Xhairy2* 機能阻害はレンズ形成を促進する組織や阻害する組織の遺伝子発現に影響を与えない．

図１９．*Xhairy2* 機能阻害は，FGF 経路の遺伝子発現に顕著な変化を与えない．

図２０．*Xhairy2* 過剰発現の効果．

図２１．*Xhairy2* 機能阻害により初期神経胚で前ニューロン遺伝子の発現が上昇するが，LF の消失は神経堤消失の二次的形質ではない．

図２２．細胞周期とその調節因子．

図２３．*Xhairy2*機能阻害により *p27*^{xic1}が確かに異所発現していることを示す二種類の傍証．

図２４．*Xhairy2*機能阻害により，後期神経胚の LF 内で細胞増殖が抑えられるが，中期神経胚では LF 内の増殖低下は見られない．

図２５．細胞周期阻害薬により一過的に細胞分裂を阻害しても LF の遺伝子発現とレンズは消失しない．

図２６．*p27*^{xic1}の変異体が細胞周期阻害に与える影響．

図２７．*p27N64S*の過剰発現は神経堤と LF 遺伝子発現の減少に関して野生型と同様の活性を示す．

図２８．*Xhairy2*機能阻害が発生後期のレンズ系譜に与える影響は *p27*^{xic1}の同時機能阻害でレスキューできない．

図２９．*Hes*ファミリー因子である *XHes2*の予備的な機能解析結果のまとめ．

９．発表論文

筆者による発表論文は以下の通りである．３は本博士論文の中核をなす内容になっているが，１と２については内容面において全く関係がない．ただ，技術的な側面では関連があるため，必要に応じて参照して頂きたい．１と３は出版社の Web page より，PDF を無料で入手できる．

1. Murato, Y., Yamaguti, M., Katamura, M., Cho, K. W. Y., and Hashimoto, C. (2006). Two modes of action by which *Xenopus* hairy2b establishes tissue demarcation in the Spemann-Mangold organizer. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 463-471.

2. Murato, Y., Nagatomo, K. Yamaguti, M., and Hashimoto, C. (2007). Two alloalleles of Xenopus laevis hairy2 gene - evolution of duplicated gene function from a developmental perspective. *Dev. Genes. Evol.* 217, 665-673.

3. Murato, Y. and Hashimoto, C. (2009). *Xhairy2* functions in *Xenopus* lens development by regulating $p27^{xic1}$ expression. *Dev. Dyn.* In press.