

左右体軸形成の分子機構

目 野 主 税

脊椎動物の内臓は、顕著な左右非対称性を示している。この左右非対称性を生み出しているのが、胚発生初期に確立される左右軸である。左右軸形成は、胚に左右の極性を生み出すことから始まり、左右非対称な形態形成に必要な遺伝子発現を確立するまでの一連の過程である。左右の極性を生み出す現象には、動物種による違いも存在するが、側板中胚葉における遺伝子カスケードは種を越えて保存されていることが明らかになった。体の頭尾軸に沿って臓器が決まった左右非対称性を示すのは、この遺伝子カスケードによるものであり、このプロセスに異常が生じるとヒトでも致命的な心奇形を引き起こす。本稿では、如何にして胚が左右非対称な臓器を獲得していくかについて、これまで得られた知見を紹介したい。

1. はじめに

私たちの体は外観こそ左右対称だが、体の内部では各種臓器が左右非対称に配置され機能している。例えば、胸腔内を見ると心臓は酸素に富んだ血液を全身に行き渡らせるために、左右で分離した心房と心室が異なる血流を受けて送出している。また、肺の分葉数も左右で異なっている。腹腔内では、胃や脾臓は体の左側に位置しており、結腸の走行も右側に始まり左側で直腸に連絡する。臓器の左右非対称性は個人個人でばらつくものではなく、種で常に一定の非対称性を示している。

このような一定した左右非対称性が重要であることは、ヒトの先天奇形からも理解することができる。ヒトでは1万から2万人に1人の割合で、臓器の左右性が完全に逆転する完全内臓逆位 (total situs inversus) が発生すると報告されている¹⁾。これよりも頻出して問題になるのが、“中途半端”な左右性の異常である。このような状態は複雑心奇形を伴うことが多いからである。部分的な左右性の異常を表す用語は幾つか存在し、臓器錯位 (heterotaxia) は一部

の臓器の左右性が異常であることを意味している。この中でも、左側相同 (left isomerism) や右側相同 (right isomerism) という用語は、それぞれ臓器形態が左右とも左側化もしくは右側化した状態を指している。臓器左右性の異常は、胚発生の初期に獲得される左右軸の異常に基づくものであり、このような左右性の異常が生じうる理由も分子レベルで理解されつつある。

左右軸形成の分子機構は、この10数年の間で大きく解明されて来た。1995年から、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエルで左右非対称に発現する遺伝子の存在が相次いで発見され、左右軸の研究が幕開けしたのである。以来、ゼブラフィッシュ、メダカ、ショウジョウバエ等も研究対象に加わり左右軸研究が大きく発展した。本稿では、左右軸研究の歴史も踏まえながら、脊椎動物における左右軸形成の分子機構を概説したい。

2. 左右非対称な形態形成

医学関連の発生学の教科書には、左右非対称な形態変化について記載されているが、臓器の左右性の理解のために簡単に説明したい。受精以降、初期胚には頭尾軸と背腹軸が確立され左右対称に発生を進めていくが、初期体節期に至ると最初の明白な左右非対称性が心臓原基に現れる。胚前方正中線上で融合する心臓原基は始め左右対称であるが、次第に頭尾軸方向に管状に伸長しながら、胚の右側へ屈曲したループを作る (心臓ルーピング)。これが心臓の

九州大学大学院医学研究院発生再生医学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1)

Molecular mechanism of left-right axis formation

Chikara Meno (Department of Developmental Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

左右性の起源であり、心臓ルーピングの方向性が逆転すると心臓の左右が逆になってしまう。心臓以外の器官の左右非対称性は、発生がさらに進行した後に獲得されていく。例えば、左側へ走行する大動脈弓(鳥類では右側へ向かう)やそこから分岐する動脈は、左右対称に形成された鰓弓動脈がリモデリングされて左右非対称に作り替えられたものである(図1F)。胃の原基は始め正中上に存在するが、原基の背側が左側を向くように回転、移動する結果、腹腔の左側に位置するようになる。ヒトで見られる結腸走行の左

右非対称性は、中腸が臍帯と背側を結ぶ軸上を反時計周りに回転する結果、生み出される。臓器が左右非対称性を獲得するための発生様式は多様であり、動物種によっても細部が異なっているが、これらすべての左右非対称性を指示するのが発生初期に確立される左右軸である。

3. 左右軸形成のアウトライン

左右形成の機構は多くの発生生物学者の興味を引き、オーガナイザーを発見したシュベーマンも、100年以上前にイモリ胚を使用して内臓逆位の研究を行っている¹⁾。その後も左右軸に関する研究はなされたものの、その理解は不十分なものであった。1995年に至り、左右非対称に発現する遺伝子が存在することがニワトリで報告されたことにより²⁾、左右軸研究が飛躍的に発展することになったのである。ここでは、左右軸形成の全体像を把握するため、この体軸が経時的にどのように形成されるかを簡単にまとめたい³⁾。

ステップ1: ノードにおける左右極性の生成

哺乳類のノード(鳥類のヘンゼン結節)は、原条の前端に位置する2層性の構造であり、脊索や神経底板を生み出す。この構造において左右非対称性を生み出すイベントが生じ、ノード周りに左右非対称な遺伝子発現が出現する。

ステップ2: ノード領域から側板中胚葉への情報の伝達

ノード周りに生じた左右非対称な情報は、沿軸・中間中胚葉の細胞層を越えて左側の側板中胚葉に伝達される。

ステップ3: 側板中胚葉における左右非対称な遺伝子発現の確立

頭尾軸に沿って *Nodal* 発現が左側側板中胚葉全体に広がる。このプロセスにより、左右の側板中胚葉は遺伝子発現レベルで異なる性質を持つようになる。

ステップ4: 左右非対称な形態形成

心臓原基及び後に形成される各種器官は、左右の側板中胚葉に生み出された遺伝子発現の差異に基づき、左右非対称な形態形成を行うことになる。胚では折り畳みと呼ばれるプロセスで原始腸管が作られ、側板中胚葉は内胚葉を包む形でここに寄与する。従って、側板中胚葉由来の細胞は原始腸管から芽出して作られる肺や腸の回転に影響を及ぼすことになる。

まず、ステップ3と4について解説し、その後にステップ1と2について解説する。

4. 左側側板中胚葉における *Nodal* 発現

Nodal はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β) スーパーファミリーに属する分泌因子である。1995年に、Levinらがニワトリ胚で *Nodal* が左右非対称に左側側板中胚葉で発現することを報告し²⁾、その数ヶ月後にはマウスやアフリカツメガエルでも *Nodal* が左側側板中胚葉で発

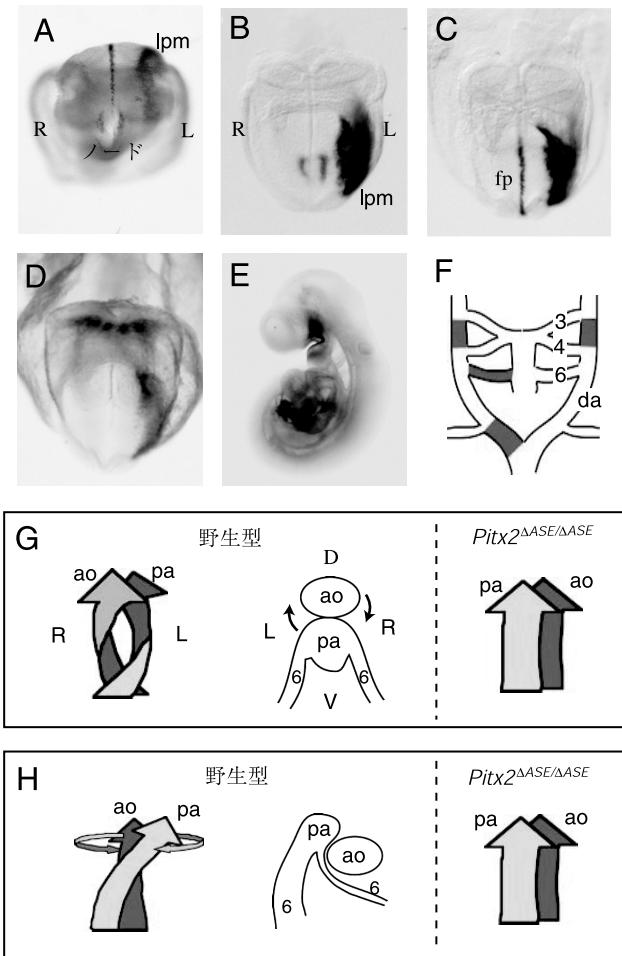


図1 マウス胚における左右非対称な遺伝子発現と形態形成の1例

(A) e8.25 胚を胚遠位から見る。 *Nodal* と *Lefty1* 発現を同時に検出している。(B-D) e8.25 胚における *Nodal* (B), *Lefty1*, 2 (C), *Pitx2* (D) の発現を、胚前方から見る。(E) e9.5 における *Pitx2* 発現。(F) 鰓弓動脈と背側大動脈のリモデリング。左右の第3, 4, 6 鰓弓動脈と背側大動脈の連絡を示している。灰色の箇所は後に消失する。(G, H) e11.5 (G) と e12.0 (H) における心臓流出路。流出路はらせん状に仕切られて、大動脈路(ao)と肺動脈路(pa)に分離する。両動脈路はらせんが巻き戻るように回転し、右側第6 鰓弓動脈が引き延ばされる。*Pitx2*^{ΔASE/ΔASE} では、らせん状に仕切られない。lpm; 側板中胚葉, fp; 神経底板, da; 背側大動脈。(Yashiro et al. 2007 から改変)

現することが報告された^{4,5)}。左側側板中胚葉における *Nodal* 発現は一過的である。マウス胚では3体節期からノード近傍の左側側板中胚葉で発現が局所的に開始し、頭尾軸に沿ってその発現域が拡張して、左側側板中胚葉の全体で発現ようになる(図1A, B)。この発現は6体節期には消失してしまうため、数時間の僅かな間だけの発現ということになる。

Nodal のシグナル伝達経路は、マウスやゼブラフィッシュ変異体の表現型の相同性から推察、同定されていた⁶⁾。その経路はTGF β スーパーファミリーのアクチビンと同じであり、受容体としてActRIIB, ActRIIA, Alk4が利用されている。*Nodal* の場合、これに加えてGPIアンカー型タンパク質Cryptic (Cfcl)が必要になる。初期体節期におけるCrypticの発現は、左右の側板中胚葉と正中に存在する神経底板やノードに局在していることから、*Nodal* はこの領域だけでシグナルを伝達することができると考えられる。*Nodal* の受容体への結合によって左側側板中胚葉ではSmad2のリン酸化が生じ、転写因子FoxH1 (FAST) をリクルートすることで下流遺伝子の発現を制御する。

Nodal の左右軸形成における役割は、*Nodal* やその下流因子の変異マウスの解析から明らかにされた。例えば、*Nodal* シグナルを伝達できないCryptic変異マウスでは、側板中胚葉における*Nodal* の発現そのものが出現せず、以下の異常が観察された⁷⁾。1: 心臓ルーピングの左右性がランダム、2: 胚ターニングの方向がランダム、3: 胃の位置の左右性がランダム、4: 無脾 (あるいは低形成)、5: 心房と肺の右側相同、6: 大血管転換 (大動脈と肺動脈の心室との結合が逆になる心臓の奇形)。すなわち、左右軸形成における*Nodal* シグナルは、方向性を伴う左右非対称な形態形成を制御し、肺の分葉数や心房形態の左側形態を規定していることになる。また、この表現型はヒトのIve-mark症候群 (無脾症候群) に酷似しており、*Nodal* シグナルの消失がこのようなヒトの病態につながるものと推察される。

Nodal が左側側板中胚葉の全域で発現することによって、頭尾軸上に配置されたすべての臓器は常に一定の左右非対称性を獲得することになる。もし、*Nodal* 発現を胚前方へ伸長できなければ、頭側に位置する心臓原基には致命的な奇形が発生するのである。左側で*Nodal* 発現域を確立することは、左右軸形成の本質であるが、*Nodal* は一体どのようなメカニズムで左側側板中胚葉で発現するのだろうか? この発現制御機構が、トランスジェニックマウス法によるシスエレメントの解析によって明らかにされた。*Nodal* のイントロン内には、左側側板中胚葉で発現するためのエンハンサー (ASE: asymmetric enhancer) が存在し、転写因子FoxH1が結合することで活性化されることが明

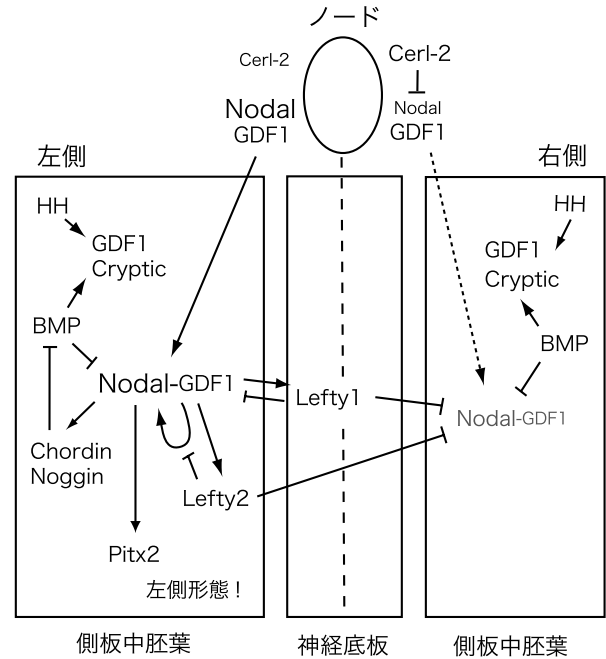


図2 マウス胚における遺伝子発現カスケード

ノードでは *Nodal* と *Cerl-2* が左右非対称に発現し、右側の *Nodal* は *Cerl-2* により抑制される。側板中胚葉では、HH や BMP シグナルによって *Nodal* シグナル伝達の場合が整えられる。ノードから拡散する *Nodal*-GDF1 ヘテロダイマーは、左側側板中胚葉で *Nodal* の発現を誘導する。一方で、*Nodal* は *Lefty* の発現を誘導することによって、自らの発現域を左側に限局させる。左側側板中胚葉の *Nodal* は、転写因子 *Pitx2* の発現を誘導し、左側形態が確立されることになる。

らになったのである^{8,9)}。FoxH1 は前述の通り *Nodal* シグナルを受ける転写因子であり、このことは *Nodal* が自らの発現を誘導するポジティブループを形成していることを意味する(図2)。左側側板中胚葉における *Nodal* 発現の拡張に、*Nodal* の拡散と自己発現誘導が利用されていると考えられる。実際、*FoxH1* を胚遠位から前方にかけての側板中胚葉で欠失させたコンディショナルノックアウト胚では、*Nodal* のポジティブループが回らないため、その発現は胚前方へ伸長していくことはなかった¹⁰⁾。

5. *Nodal* 発現の左側への限局

Nodal ポジティブループは、自己増殖の機構である。それでは、何故 *Nodal* 発現はこれほどまで一過的であり、また左側に限局できるのだろうか? この抑制的な役割を、TGF β スーパーファミリーに属する分泌因子 *Lefty1*, *Lefty2* が担うことが明らかになった^{11,12)}。 *Lefty* は、*Nodal* が受容体に結合するのに競合する、もしくは *Nodal* に直接結合することにより、*Nodal* シグナルを阻害すると考えられている^{6,13)}。初期体節期における *Lefty* の発現は *Nodal* 発現と関連している。 *Lefty2* は *Nodal* と同じパターンで左

側側板中胚葉に出現し、*Lefty1* の発現は神経底板の左側を胚前方へと伸長するが、これは側板中胚葉の *Nodal* 発現が胚前方へ伸長するのと同調している (図 1C)。

Lefty2 の発現を制御する機構を明らかにするため、トランスジェニックマウス法によってエンハンサーが同定された¹⁴⁾。このエンハンサー (ASE) は、*Nodal* ASE と同様な活性を示し、やはり転写因子 FoxH1 が結合することで活性化されるエンハンサーであった⁸⁾。つまり、左側側板中胚葉の *Lefty2* 発現も *Nodal* によって誘導されていることになる。これを裏付けるように、側板中胚葉で *Nodal* 発現が出現しないような変異マウス (例えば、*Cryptic* 変異) では、*Lefty2* の発現が出現することはない、さらには正中の神経底板における *Lefty1* 発現も胚前方に伸長していくことはない^{7,10)}。このことは、*Nodal* が左側側板中胚葉から神経底板まで拡散して *Lefty1* を誘導することを示唆するものであり、その発現の左右性も説明されることになる。実際、エレクトロポレーションによる側板中胚葉への局所的遺伝子導入の実験などによって、*Lefty1* 発現が側板中胚葉の *Nodal* によって直接誘導されることが示された¹⁰⁾。このように、*Nodal* は *Lefty* を介したネガティブループを形成している (図 2)。

私たちは、*Lefty* の左右軸形成における役割を、変異マウスの作成によって明らかにした。*Lefty1* 変異マウスでは、左側側板中胚葉で *Nodal* 発現が出現した後、胚前方の右側側板中胚葉に *Nodal* 発現が異所的に出現した¹⁵⁾。*Lefty1* 非存在下においては、左側側板中胚葉の *Nodal* が拡散し右側で *Nodal* 発現を誘導したものと考えられる。*Nodal* の両側性の発現によって様々な左右の異常が出現したが、その異常は右側の臓器形態が左側化する左側相同で特徴づけられ、前述の大血管転換や両大血管右室起始 (肺動脈と大動脈がともに右心室と結合する) などの心臓奇形が生じた。*Lefty2* の変異マウスは、ヌル変異がより早い時期に原腸胚形成異常を示すため、エンハンサー ASE を欠失させることによって作出した¹⁶⁾。この変異マウスでは、初期体節期における *Lefty2* 発現が出現しないことになる。*Lefty2* 変異胚では、左側側板中胚葉全域で *Nodal* 発現が出現した後に、その前後端から右側へと *Nodal* の下流遺伝子 *Pitx2* (後述する) の発現が回り込んでいくことが明らかになった。また、*Nodal* ポジティブループが回り続けるため、左側側板中胚葉の *Nodal* 発現は消失が遅れ続けた。*Nodal* のフィードバック阻害因子である *Lefty* は、*Nodal* 及び *Pitx2* 発現を胚の左側に限局させるために必要ということである。

Nodal シグナルのフィードバック阻害は、マウス以外の種でも観察される。アフリカツメガエルやゼブラフィッシュにおいても *Lefty* は、*Nodal* シグナルによって誘導される。ニワトリの *Lefty* は、マウス *Lefty1* のように主とし

て神経底板と脊索で発現されるが¹⁷⁾、側板中胚葉における *Lefty2* の役割は *Cerberus*/*DAN* ファミリーの分泌因子 *Caronte* が担うようである。*Caronte* プロモーターの上流には転写因子 FoxH1 と Smad の結合部位が存在しており、*Nodal* シグナルを受けて活性化される¹⁸⁾。morpholino オリゴによって左側側板中胚葉の *Caronte* を抑制すると、マウス *Lefty* 変異マウスのように左右側板中胚葉で *Nodal* が発現することが報告された。

6. 側板中胚葉の *Nodal* 発現に影響する因子

このように *Nodal* ポジティブループとネガティブループで左側側板中胚葉の *Nodal* 発現域が確立されるが、この機構が働きの場が整わないと *Nodal* 発現は異常になると考えられる。例えば、Hedgehog シグナルが伝達されない *Smoothed* 変異マウスでは、後述する *Gdf1* 及び *Cryptic* の側板中胚葉やノードにおける発現が消失するため、*Nodal* 発現が消失してしまう¹⁹⁾。

骨形成タンパク質 (BMP) シグナルも側板中胚葉で *Nodal* が発現するために必要である。ニワトリ胚や *BMP4* 変異マウスの解析から、側板中胚葉で BMP シグナルが消失すると、*Cryptic* (ニワトリでは *Cfc*) の発現が消失してしまうことが報告されている²⁰⁻²²⁾。しかしながら、BMP シグナルは *Nodal* 発現のための場をもたらしとともに、*Nodal* 発現を抑制するという一見すると相反した役割を担うようである。実は、前述のニワトリ *Caronte* は、左側側板中胚葉で発現し、BMP シグナルを抑制することで *Nodal* 発現を誘導する因子として報告されたものである^{23,24)}。マウスにおいても、BMP シグナルを伝達する *Smad5* の変異マウスでは、左右の側板中胚葉で *Nodal* が発現してしまう²⁵⁾。さらに、最近になり BMP アンタゴニストの *Chordin*, *Noggin* が左側側板中胚葉で右側よりも強く発現することが報告された²⁶⁾。この左右非対称な発現は左側側板中胚葉の *Nodal* シグナルによって生み出されており、左側で BMP シグナルが一過的に抑制される。*Chordin*, *Noggin* の二重変異マウスでは *Nodal* 発現が出現しないことから、*Nodal* フィードバックループに組み込まれた BMP シグナル抑制が *Nodal* 発現に必要であることが理解される (図 2)。

7. *Pitx2* 発現と左右非対称な形態形成

左側側板中胚葉における *Nodal* 発現は、心臓ルーピングが起こる前に早くも消失してしまう。心臓以外の器官はさらに発生が進行してから形成されるため、*Nodal* 以外の因子が後の左右非対称な形態形成に関与するはずであるが、この役割を担うのが転写因子 *Pitx2* である (図 1D, E)。*Pitx2* は、もともとヒト Rieger 症候群 (常染色体優性変異) の原因遺伝子として同定されたものであり、様々な動物種において左側側板中胚葉の細胞系譜で持続的に発現

することが明らかにされた。*Pitx2* の発現制御も、トランスジェニックマウス法によるシス解析によって明らかになった²⁷⁾。*Pitx2* のイントロンには、左側側板中胚葉の細胞系譜における発現を担うエンハンサー (ASE) が存在し、やはり *Nodal* シグナルを受ける転写因子 FoxH1 が結合することで活性化する。さらに、その近傍には転写因子 Nkx2 の結合部位が存在しており、Nkx2 の結合は左側側板中胚葉の細胞系譜でエンハンサー活性を持続させるために必要である。

左右形成における *Pitx2* の機能は、ヌル変異や *Pitx2* ASE 欠失マウスの作成によって明らかにされている²⁸⁻³⁰⁾。変異マウスでは、心臓ルーピングの方向性は正常であることから、これらのプロセスは *Nodal* シグナルに依存するが *Pitx2* が制御している訳ではないことが理解される。予想された通り、肺や心房は右側相同を示し、心臓には兩大血管右室起始 (DORV) を特徴とした奇形が発生した。血管走行や腸ループの方向性にも異常が発生し、*Pitx2* は多くの器官の左右非対称性を担うことが明らかになった。

Pitx2 による形態形成制御の実体には不明な点が多いが、鰓弓動脈のリモデリングに関しては心臓流出路の形成に関与することで大きな影響を及ぼすことが明らかになった (図 1F-H)³¹⁾。心臓周りの大血管は、始め左右対称に生じた鰓弓動脈が左右非対称に消失することで形成される。鰓弓動脈は、心臓流出路先端に位置する大動脈囊から派生して背側大動脈へと連絡している。始め左右に形成された第 6 鰓弓動脈は、その近位が肺動脈になり、右側の遠位は消失し背側大動脈との連絡を失うが、左側遠位では動脈管として出生まで肺動脈血を大動脈へ逃がしている。心臓流出路は、1 本の管 (動脈幹と心円錐) がらせん状に仕切られて大動脈と肺動脈になる。*Pitx2* 変異マウスではこの仕切りがらせん状に形成されず、第 6 鰓弓動脈の左右性がランダムとなる。正常胚では、流出路を分離する一連の過程で、右側の第 6 鰓弓動脈が引き延ばされ細くなる結果、左側へ向かう血流量が優位になる。この血流動態によって、血小板由来増殖因子及び血管内皮細胞増殖因子のシグナルが左側第 6 鰓弓動脈のみに生じるようになり、右側第 6 鰓弓動脈は退縮していくことが明らかになった。

鳥類の大多数の種では、雌の卵巣は左側だけに形成されることが知られている。この左右非対称性も *Pitx2* によって制御されることが明らかになった³²⁾。始め卵巣の原基である生殖巣は左右対称に形成されるが、左側の生殖巣の皮質では *Pitx2* が発現する。この領域の *Pitx2* は、レチノイン酸合成酵素 (RALDH2) の発現を抑制するため、*Pitx2* 発現が存在しない右側皮質ではレチノイン酸シグナルが入ることになる。レチノイン酸は皮質の細胞増殖を抑制し、エストロゲン受容体 α の発現を抑制することで、卵巣の発達を阻害する。一方、左側生殖巣の皮質ではレチノイ

ン酸シグナルが抑制され、転写因子 Ad4BP/SF-1 が発現する。Ad4BP/SF-1 は *CyclinD1* の発現を誘導し、皮質の細胞の増殖を促す。このようにして、*Nodal-Pitx2* 経路は卵巣の発生の非対称性をも生み出すことになる。

8. ノードから側板中胚葉へのシグナル伝達

左側側板中胚葉における *Nodal-Pitx2* 経路は脊椎動物の左右形成において本質的な役割を担っている。それでは、ノード近傍の側板中胚葉で最初に *Nodal* を発現させる仕組みはどのようなものだろうか？ ニワトリではヘンゼン結節の左側における Sonic Hedgehog (Shh) が、別の因子を誘導して側板中胚葉へシグナルを伝達していることが示されていたが、マウスでは *Nodal* そのものがその役を担うようである。*Nodal* は、側板中胚葉で発現する以前からノードにおいても左右非対称に発現する (crown cell と呼ばれるノードの“土手”のところ)^{4,5)}。その発現は Notch シグナルによって誘導されており、始め左右対称であるが次第に左側が強い左右非対称性を示すようになる。ノード (及びその相同構造) の *Nodal* 発現の左右非対称性には種間の相違があり、アフリカツメガエルやゼブラフィッシュでは左右対称に発現し、ニワトリでは左側だけで発現している。

マウスでは、ノードにおける *Nodal* 発現が左側側板中胚葉の *Nodal* 発現に必要なことが示された。*Nodal* のシスエレメントを改変することでノードの *Nodal* 発現を消失させると、側板中胚葉における *Nodal* 発現が開始しなくなることが見出されたのである^{33,34)}。前述したように、*Nodal* はポジティブループの機構を有している。ノード由来の *Nodal* が直接拡散して側板中胚葉にそのシグナルを伝えるとすると、ポジティブループで *Nodal* 発現が誘導されると考えられる。しかしながら、*Nodal* が別の因子を介してリレー方式でシグナルを側板中胚葉に伝達する可能性も排除できない。そこで、*Cryptic* 変異マウスの側板中胚葉に *Cryptic* を発現させたトランスジェニックマウスが作成された³⁵⁾。このマウスは正中領域の *Cryptic* を欠いているため、もし *Nodal* がリレー方式でシグナルを伝達しているとする、側板中胚葉には *Nodal* 発現が出現しないはずである。結果は、*Nodal* 発現が側板中胚葉に現れ、*Nodal* が直接拡散していることを支持するものであった。さらに、*Nodal* の直接拡散は別の手法でも示唆された。ショウジョウバエでは、TGF β スーパーファミリーの Dpp が拡散するには細胞外基質の存在が必要であると報告されている。同様に、*Nodal* も細胞外基質を構成するコンドロイチン硫酸に結合することが明らかになった³⁵⁾。コンドロイチン硫酸を含む細胞外基質は、ノードから側板中胚葉まで内外胚葉を裏打ちするように存在している (図 3D)。マウス胚でコンドロイチン硫酸を合成する経路を阻害する

と、側板中胚葉における *Nodal* 発現が消失することが示された。

ノードの *Nodal* が拡散して作用を及ぼすためには、TGF β スーパーファミリーの GDF1 が必要になる³⁶⁾。GDF1 は、左右側板中胚葉とノードで発現する分泌因子であり、その変異マウスでは側板中胚葉の *Nodal* 発現が消失してしまう³⁷⁾。アフリカツメガエルを用いた系では、マウス GDF1 は Smad2 を介した中胚葉誘導活性を有していることが知られていたが、GDF1 が単独で機能するのならば左右の側板中胚葉に *Nodal* 様のシグナルを入れていてもおかしくないはずである。しかしながら、これは実際には起こっていない。TGF β スーパーファミリーは二量体を形成して機能することから、マウス初期胚で共発現する *Nodal* と *Gdf1* は、ヘテロダイマーを形成して初めて機能する可能性が想定された³⁶⁾。実際、アフリカツメガエルを用いた系では、両者の mRNA が存在するとヘテロダイマーを形成し、その活性も大きく亢進することが明らかになった。さらに、*Gdf1*^{-/-}胚の側板中胚葉に *Gdf1* を発現させても、表現型はレスキューされないが、ノードで *Gdf1* を発現させた場合、左側側板中胚葉に *Nodal* 発現が誘導された。これらの結果から、ノード由来の *Nodal* が拡散し側板中胚葉にシグナルを入れるには、GDF1 とヘテロダイマーを形成する必要があるということが理解される。

9. 左側か、それとも右側か：左右初期決定の問題

ここで素朴な疑問が生じる。どうして *Nodal* は側板中胚葉の左側だけで発現するのだろうか？ *Nodal* がノードで発現するのならば、左側だけではなく右側にもそのシグナルが伝達されていても良いはずである。その答えの一つは、マウス *Cerl-2* 及びゼブラフィッシュ *Charon* の解析から明らかになった^{38,39)}。両因子は、Cerberus/DAN ファミリーに属する分泌因子であり、*Nodal* と結合することによってその活性を阻害する。*Cerl-2* は初期体節期のマウス胚ノードで *Nodal* と重なって発現するが、右側の発現が左側よりも強いという左右非対称性を示している。*Cerl-2* 変異マウスには、バリエーションをとまって左右の異常が現れることが報告された。大多数の胚の左側側板中胚葉には *Nodal* が発現したが、そのうちの半数には右側でも *Nodal* 異所発現が認められたのである。恐らく正常胚では *Nodal* と *Cerl-2* の相反する非対称性から、右側の *Nodal* の活性が抑制されており、このことが左側側板中胚葉だけで *Nodal* が発現するために必要と考えられる。ゼブラフィッシュでの解析でも *Nodal* の抑制が必要であることが示されている。ノードの相同構造であるクッパー胞には、*Southpaw* (ゼブラフィッシュの *Nodal* の一つ) と *Charon* が隣接して左右対称に発現する^{38,40)}。*Southpaw* はクッパー胞で発現した後に左側側板中胚葉で左右非対称に

発現するが、*Charon* はクッパー胞領域の *Southpaw* を抑制することで、右側側板中胚葉でも *Southpaw* が発現するのを防いでいることが明らかになった。ゼブラフィッシュにおいては *Southpaw* と *Charon* 共に左右対称であり、別の因子が *Nodal* 活性の非対称性を規定しているのかもしれない。

さらに、マウスの解析からはノード右側の *Nodal* 抑制だけでは、正しい左右初期決定には不十分であることが示された。ここに、前述した *Nodal* のポジティブループとネガティブループが大きく関与していることが明らかになったのである⁴¹⁾。本来、左右の側板中胚葉は *Nodal* が発現する以前は等価であり、右側の側板中胚葉も *Nodal* を発現しうる。マウスの右側側板中胚葉に *Nodal* 発現ベクターを局所的に導入すると、その箇所から内在の *Nodal* の発現がポジティブループによって右側全域に拡張する。驚くことに、そのような処理をした胚には左側側板中胚葉の *Nodal* 発現が開始しない現象が見出された。この左側の抑制は、右側の *Nodal* によって誘導される *Lefty* によってもたらされていた。このことは、先に *Nodal* を発現した方が反対側の発現を抑制することを示すものであり、事実、正常胚の左側側板中胚葉で *Nodal* シグナルを抑制すると右側側板中胚葉でも *Nodal* 発現が出現した。マウスでは、ノード領域の左右非対称な *Nodal* を受けて左側で先に *Nodal* 発現が誘導されるため、*Lefty* を介して右側の *Nodal* 発現が抑制されることになる。

マウス胚における左右初期決定を深く理解するために、ノードのレベルにおける *Nodal* と *Lefty* 発現をシミュレートする微分方程式が立てられた⁴¹⁾。このシミュレーションで初期決定条件について検討を行ったところ、側板中胚葉への *Nodal* シグナルの入力が弱くなると、左右の側板中胚葉で *Nodal* が発現するケースがあるとの奇妙な結果が得られた。直感では、*Nodal* シグナルが減弱していくと、いずれ *Nodal* 発現が消失して右側相同が生じるはずである。この結果を検証するため、*FoxH1* を側板中胚葉で消失させた変異マウスを詳細に観察すると、稀に左側相同が出現したのである。このコンディショナルノックアウトでは、*FoxH1* の欠失が不十分なためこのような表現型が出現したのと考えられる。興味深いことに、ヒトでは臓器の左右性に異常がある多数の患者に *CFC1* (ヒトの *CRYPTIC*) の突然変異が検出されたが、想定された右側相同の他にも左側相同の症例があった⁴²⁾。左側相同のケースでは *CFC1* がヘテロ接合であったが、この患者は胎生期に *NODAL* シグナルが減少することによって、*NODAL* が左右で発現したのかもしれない。

10. ノードにおけるノード流

ここまで、ノード領域の遺伝子発現の僅かな左右差が側

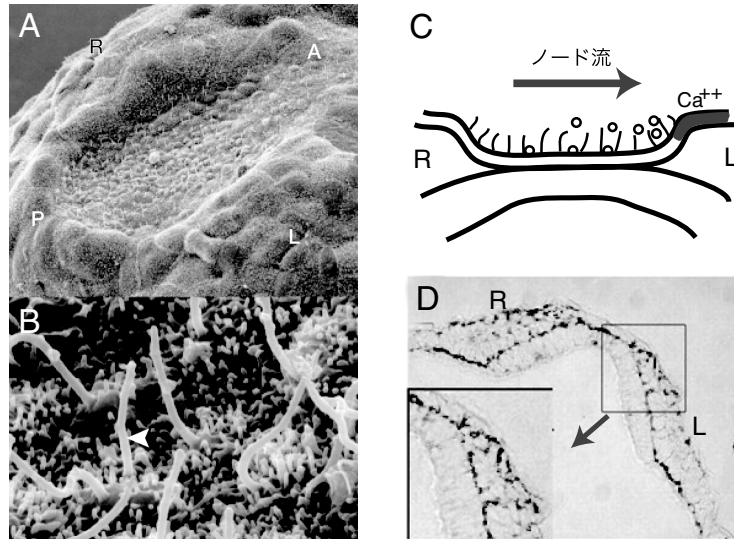


図3 マウス胚の繊毛とノード流

(A) ノード領域の走査電子顕微鏡像。中央の凹みがノード。(B) 拡大すると繊毛(矢頭)が認められる。(C) モデル図。ノード腹側層の頂端面からNVPが放出され、左側に流される。(D) ノードを含む切片。細胞外基質成分であるグリコサミノグリカンを染色している。(Hamada et al. 2002, Oki et al. 2007 から改変)

板中胚葉における確実な *Nodal* 発現へと転換され、左右非対称な形態形成に至ることを説明して来た。それでは、ノード領域でこのような最初の左右非対称性を生み出すイベントとはどのようなものであろうか？ 繊毛がこのような左右の形成に深く関与しているのではないかとアイディアは、古くから提唱されていた。ヒトでは、カルタゲナー症候群と呼ばれる内臓逆位、気管支拡張症、副鼻腔炎を特徴とした病気が知られている。1976年には、精子の運動性が消失した複数の男性患者にカルタゲナー症候群が見出され、この症候群の症因は繊毛が不動になることにありと報告された⁴³⁾。マウスでは、1959年に50%の確率で内臓逆位が生じる劣性変異マウス *iv* が報告され、カルタゲナー症候群との比較から気管繊毛の運動性や形態が調べられたが、繊毛に異常は見出されなかった。1994年には、初期体節期のマウス胚のノード腹側層と脊索板に存在する繊毛(primary cilia もしくは monocilia と呼ばれる。図3A, B) が運動性を有していることが報告され、左右形成との関連が論じられている⁴⁴⁾。1998年、驚くべき現象がマウスのノードで見出された。ノードに繊毛が形成されない *Kif3b* 変異マウスの解析から、正常胚ではこの繊毛が時計周りに回転して、左向き水流(ノード流)を生み出していることが報告されたのである⁴⁵⁾。

左向きのノード流が単なる現象だけでなく左右軸形成の実際の引き金となっていることは、人工的に右向きのノード流を作り出すことで証明された⁴⁶⁾。マウス胚は初期体節期まで円筒状の形態をしており、将来の胎盤とノード領域

は胚の対極に位置している。この形状を利用して、培地を一方に流すことができるチャンバーに穴をあけ、その穴に胚を胎盤側から差し込むとノードが培地にさらされる。胚に対して右向きに培地を流したところ、*Pitx2* 発現の左右非対称性が逆転することが判明した。また、これまでにノードの繊毛の異常がもとで、左右軸形成に異常を来す変異マウスが多数報告されている。前述の *iv* マウスの原因遺伝子が同定され、ノードで発現する軸系ダイニンの一種(*Lrd*)をコードする遺伝子であることが判明した⁴⁷⁾。*iv/iv* 胚のノード繊毛は不動になっており、ノード流が形成されないため *Nodal* 発現の左右性がランダムになる⁴⁸⁾。鞭毛内輸送(intraflagellar transport: IFT)に関わる遺伝子の変異も左右軸形成の異常につながる。例えば、前述の *Kif3* や *polaris*, *wimple* などのIFT関連遺伝子の変異マウスでは、ノードの繊毛は形成されない。さらに、繊毛は *Shh* のシグナル伝達にも必須であり、IFTの変異マウスは中軸における *Shh* シグナルを欠失することになる。IFT変異では、両要素の欠失によって、左右軸形成に異常を来すのである。

マウス胚で発見されたノード流が、左右軸形成の引き金として種を越えて普遍的機構であるのかを確認するため、各種動物で *Lrd* の発現部位が調べられた⁴⁹⁾。ニワトリ胚ではヘンゼン結節、アフリカツメガエルでは原口背唇部の腹側層、ゼブラフィッシュ胚の forerunner 細胞(クッパー胞の前駆体)に局限した発現が観察された。さらに、これらの領域には繊毛も確認され、左右軸形成におけるマウス胚

ノードの相同構造物であると考えられる。これまでに、マウス胚のノード流に相当する左向きの水流が、ゼブラフィッシュ、メダカ、ウサギ、アフリカツメガエルでも観察されており、これらの動物種で水流を阻害する実験を行うと、左右に異常が生じることも確認された。

11. ノード流の作用機序

このように、多くの脊椎動物で左向きの水流が見出されたが、その水流がどのようにして左右軸形成を引き起こすかも明らかになりつつある。そのヒントは多発性嚢胞腎の研究から得られた。繊毛はノードの細胞に限られたものではなく多くの種類の細胞に認められ、腎臓の集合管も発達した繊毛を有している。興味深いことに、左右異常と腎臓の病気は関連していることがあり、*inv* や *polaris* 変異マウスには内臓逆位とともに多発性嚢胞腎が発生する^{50,51}。ヒトでは、常染色体性優性多発性嚢胞腎の原因遺伝子の一つとして *PKD2* がクローニングされた。*PKD2* は、カルシウムチャネルとして機能する polycystin-2 (PC2) をコードし、この PC2 は繊毛に局在している。腎臓の上皮細胞を培養すると発達した繊毛が形成されるが、この培養細胞に水流の刺激を与えると PC2 依存的に Ca^{2+} が流入することが報告された⁵²。このようなメカノセンサーとしての繊毛の機能が、マウス胚のノードにも見出されたのである⁵³。ノードには、運動性を有する繊毛と *Lrd* が局在しないため運動性が無い繊毛の 2 種類が存在することが観察された。特に、運動性を欠くものはノードの左右と前方の縁に存在しており、ノード流は中央に位置する繊毛運動によって形成されていることになる。これらの繊毛にはやはり PC2 が存在しており、ノード領域における細胞内のカルシウムを検出したところ、左側の縁のみにカルシウムの流入が観察された。*Pkd2* 変異マウスには、このようなカルシウムの流入が観察されず、側板中胚葉の *Nodal* 発現が消失する⁵⁴。このようにして、ノードの左向きの水流は運動性を欠いた繊毛を物理的に刺激することで、左側の細胞内にカルシウムシグナルを流入させるというモデルが提唱された。

さらに、ノード流の作用機序を説明する重要な発見がなされた。細胞膜で包まれた直径数ミクロンの粒子 (nodal vesicular parcel: NVP) が、ノード腹側層細胞の頂端側から飛び出て来て、ノード流に乗ってノード左壁へと運搬されていたのである⁵⁵。NVP の形成は FGF シグナルに依存しており、さらに NVP は Shh とレチノイン酸を含有していることが見出された。ノードの左側で見られるカルシウムの流入は、ノード流による繊毛の物理的な刺激というよりも、Shh やレチノイン酸シグナルに依存するものであった (図 3C)。

12. ニワトリ胚における左右決定

左右軸形成の初期の機構については、種間における違いが認められる。ニワトリ胚のヘンゼン結節には、様々な遺伝子が左右非対称に発現しており、遺伝子カスケードを形成していることが知られている。マウスでは、左右対称に発現する遺伝子も、ニワトリにおいては左右非対称に現れることが多いのである。例えば、ヘンゼン結節の右側ではアクチビンとその受容体が左右非対称に発現する。右側のアクチビンシグナルは *BMP4* の発現を誘導し、この局所的 BMP シグナルは右側の *Shh* の発現を抑制するとともに *Fgf8* の発現を誘導する⁵⁶。一方の左側では *Shh* と *Nodal* が発現する²。このヘンゼン結節の左右非対称な遺伝子発現は、最終的に左側側板中胚葉で *Nodal* が発現するためになる。

多くの種でノード相同構造物に左向きの水流が観察されているが、ニワトリ胚においては未確認である。左向きの水流が左右軸形成の引き金になるというのは、種を越えた普遍的な原理ではないのかもしれない。実際、このような遺伝子発現の左右非対称性を制御する初期機構は、遙か卵割期までさかのぼる可能性がアフリカツメガエルの解析で報告された。アフリカツメガエルやニワトリ胚の左右性に影響を及ぼす薬剤がスクリーニングされ、 H^+/K^+ -ATPase の阻害が左右軸形成に影響を及ぼすことが見出された⁵⁷。アフリカツメガエルでは、4 細胞期の時点までに H^+/K^+ -ATPase α mRNA が左右非対称に局在するようになり、左植物極側の割球では mRNA が消失する。ニワトリにおいては、このような H^+/K^+ -ATPase 発現の左右非対称性は見られないが、機能的に左右非対称性であることが見出された。 H^+/K^+ -ATPase は細胞内の H^+ を細胞外に排出し K^+ を取り入れることで、細胞膜電位を低下させる。そこで、ニワトリ胚で細胞膜電位を検出したところ、ヘンゼン結節の左側は H^+/K^+ -ATPase に依存して脱分極していたのである。さらに、この H^+/K^+ -ATPase が、細胞外カルシウム濃度の左右非対称性を生み出していることが報告された⁵⁸。ニワトリ胚では左側の細胞外カルシウム濃度が右側よりも高く、このことが Dll1 と Notch の結合を堅固なものにし、増強された Notch シグナルがヘンゼン結節左側の *Dll1* 発現をもたらすことが示された。マウス胚同様、ニワトリ胚においてもヘンゼン結節横の *Nodal* 発現は Notch シグナルに依存しており、細胞外カルシウム濃度の非対称性が *Nodal* 発現の左右差につながるとされた。

13. おわりに

左右非対称に発現する遺伝子が発見されてから、左右軸の理解は大きく進展してきた。このような遺伝子から上へ下へと解析が進み、また左右異常の変異マウスの解析など

からその全貌が見えるようになってきた。マウスの解析からは、ノード流という思いもよらない生命現象が発見されたように、胚が対称から非対称を生み出す仕組みには興味が尽きない。脊椎動物においては、側板中胚葉の *Nodal-Pitx2* のカスケードは保存されているが、左右軸形成の初期については種の違いも見受けられる。このような相違は、進化の過程を反映したものであろうか。それとも、すべてを包容し統合するような機構が存在するのだろうか。さらなる解析が望まれるところである。

本稿は、脊椎動物の左右軸形成の全般について、歴史的経緯も踏まえながらまとめたものである。多くの優れた研究がこの分野の発展に寄与してきたが、すべての論文を紹介できている訳ではないことをご容赦願いたい。

文 献

- 1) Fujinaga, M. (1997) *International Journal of Developmental Biology*, 41, 153-186.
- 2) Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., & Tabin, C. (1995) *Cell*, 82, 803-814.
- 3) Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., & Saijoh, Y. (2002) *Nature Reviews Genetics*, 3, 103-113.
- 4) Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., & Kuehn, M.R. (1996) *Nature*, 381, 158-161.
- 5) Collignon, J., Varlet, I., & Robertson, E.J. (1996) *Nature*, 381, 155-158.
- 6) Shen, M.M. (2007) *Development*, 134, 1023-1034.
- 7) Yan, Y.T., Gritsman, K., Ding, J., Burdine, R.D., Corrales, J. D., Price, S.M., Talbot, W.S., Schier, A.F., & Shen, M.M. (1999) *Genes & Development*, 13, 2527-2537.
- 8) Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C.Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Kawabata, M., Miyazono, K., Whitman, M., & Hamada, H. (2000) *Molecular Cell*, 5, 35-47.
- 9) Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., & Hamada, H. (1999) *Genes & Development*, 13, 1589-1600.
- 10) Yamamoto, M., Mine, N., Mochida, K., Sakai, Y., Saijoh, Y., Meno, C., & Hamada, H. (2003) *Development*, 130, 1795-1804.
- 11) Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., & Hamada, H. (1997) *Genes to Cells*, 2, 513-524.
- 12) Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., & Hamada, H. (1996) *Nature*, 381, 151-155.
- 13) Sakuma, R., Ohnishi, Y., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Takeuchi, J., Ogura, T., Li, E., Miyazono, K., & Hamada, H. (2002) *Genes to Cells*, 7, 401-412.
- 14) Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A., & Hamada, H. (1999) *Genes & Development*, 13, 259-269.
- 15) Meno, C., Shimon, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., & Hamada, H. (1998) *Cell*, 94, 287-297.
- 16) Meno, C., Takeuchi, J., Sakuma, R., Koshiba-Takeuchi, K., Ohishi, S., Saijoh, Y., Miyazaki, J., ten Dijke, P., Ogura, T., & Hamada, H. (2001) *Developmental Cell*, 1, 127-138.
- 17) Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., Wright, C.V., Hamada, H., Ohuchi, H., & Noji, S. (2000) *Mechanisms of Development*, 90, 115-118.
- 18) Tavares, A.T., Andrade, S., Silva, A.C., & Belo, J.A. (2007) *Development*, 134, 2051-2060.
- 19) Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M., & McMahon, A.P. (2001) *Cell*, 105, 781-792.
- 20) Fujiwara, T., Dehart, D.B., Sulik, K.K., & Hogan, B.L. (2002) *Development*, 129, 4685-4696.
- 21) Schlange, T., Arnold, H.H., & Brand, T. (2002) *Development*, 129, 3421-3429.
- 22) Piedra, M.E. & Ros, M.A. (2002) *Development*, 129, 3431-3440.
- 23) Rodriguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A.N., Pascual, J., Ortiz, A., & Izpisua Belmonte, J.C. (1999) *Nature*, 401, 243-251.
- 24) Yokouchi, Y., Vogan, K.J., Pearse, R.V., 2nd, & Tabin, C.J. (1999) *Cell*, 98, 573-583.
- 25) Chang, H., Zwijsen, A., Vogel, H., Huylebroeck, D., & Matzuk, M.M. (2000) *Developmental Biology*, 219, 71-78.
- 26) Mine, N., Anderson, R.M., & Klingensmith, J. (2008) *Development*, 135, 2425-2434.
- 27) Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M., & Hamada, H. (2001) *Molecular Cell*, 7, 137-149.
- 28) Shiratori, H., Yashiro, K., Shen, M.M., & Hamada, H. (2006) *Development*, 133, 3015-3025.
- 29) Lu, M.F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R.L., & Martin, J. F. (1999) *Nature*, 401, 276-278.
- 30) Lin, C.R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J.C., & Rosenfeld, M.G. (1999) *Nature*, 401, 279-282.
- 31) Yashiro, K., Shiratori, H., & Hamada, H. (2007) *Nature*, 450, 285-288.
- 32) Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., Chandraratna, R.A., Morohashi, K., & Yoshioka, H. (2008) *Development*, 135, 677-685.
- 33) Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., & Hamada, H. (2003) *Developmental Biology*, 256, 160-172.
- 34) Brennan, J., Norris, D.P., & Robertson, E.J. (2002) *Genes & Development*, 16, 2339-2344.
- 35) Oki, S., Hashimoto, R., Okui, Y., Shen, M.M., Mekada, E., Otani, H., Saijoh, Y., & Hamada, H. (2007) *Development*, 134, 3893-3904.
- 36) Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H., & Saijoh, Y. (2007) *Genes & Development*, 21, 3272-3282.
- 37) Rankin, C.T., Bunton, T., Lawler, A.M., & Lee, S.J. (2000) *Nature Genetics*, 24, 262-265.
- 38) Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M., & Suzuki, T. (2004) *Development*, 131, 1741-1753.
- 39) Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., & Belo, J.A. (2004) *Genes & Development*, 18, 2342-2347.
- 40) Long, S., Ahmad, N., & Rebagliati, M. (2003) *Development*, 130, 2303-2316.
- 41) Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C., & Hamada, H. (2006) *Developmental Cell*, 11, 495-504.
- 42) Bamford, R.N., Roessler, E., Burdine, R.D., Saplakoglu, U., dela Cruz, J., Splitt, M., Goodship, J.A., Towbin, J., Bowers,

- P., Ferrero, G.B., Marino, B., Schier, A.F., Shen, M.M., Muenke, M., & Casey, B. (2000) *Nature Genetics*, **26**, 365–369.
- 43) Afzelius, B.A. (1976) *Science*, **193**, 317–319.
- 44) Sulik, K., Dehart, D.B., Iangaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K., & Schoenwolf, G.C. (1994) *Developmental Dynamics*, **201**, 260–278.
- 45) Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., & Hirokawa, N. (1998) *Cell*, **95**, 829–837.
- 46) Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., & Hamada, H. (2002) *Nature*, **418**, 96–99.
- 47) Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., & Brueckner, M. (1997) *Nature*, **389**, 963–966.
- 48) Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., & Hirokawa, N. (1999) *Molecular Cell*, **4**, 459–468.
- 49) Essner, J.J., Vogan, K.J., Wagner, M.K., Tabin, C.J., Yost, H. J., & Brueckner, M. (2002) *Nature*, **418**, 37–38.
- 50) Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C. A., Elder, F.F., & Overbeek, P.A. (1993) *Science*, **260**, 679–682.
- 51) Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., & Woychik, R.P. (2000) *Development*, **127**, 2347–2355.
- 52) Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E., & Zhou, J. (2003) *Nature Genetics*, **33**, 129–137.
- 53) McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., & Brueckner, M. (2003) *Cell*, **114**, 61–73.
- 54) Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., & Dworniczak, B. (2002) *Current Biology*, **12**, 938–943.
- 55) Tanaka, Y., Okada, Y., & Hirokawa, N. (2005) *Nature*, **435**, 172–177.
- 56) Monsoro-Burq, A. & Le Douarin, N.M. (2001) *Molecular Cell*, **7**, 789–799.
- 57) Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K.R., Nogi, T., & Mercola, M. (2002) *Cell*, **111**, 77–89.
- 58) Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Ibanes, M., Rasskin-Gutman, D., Rodriguez-Leon, J., Buscher, D., Feijo, J. A., & Izpisua Belmonte, J.C. (2004) *Nature*, **427**, 121–128.
-