

■原 著■

有尾目両生類イベリアトゲイモリの外鰓の 形態形成における Sonic hedgehog シグナル伝達経路の役割について

桃井 環^{1,3} 豊泉龍児^{1,2}

Study on the Role of the Sonic hedgehog Signaling Pathway in the
Morphogenesis of Urodelan External Gills

Tamaki Momoi^{1,3} and Ryuji Toyozumi^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: tmk.momotaro@gmail.com

Abstract: Developing external gill of the urodelan larva is a good model for the study of the organogenesis of vertebrate respiratory organ. We can observe the entire process of the branching morphogenesis of the newt external gills non-invasively, so the newt gills are amenable to experimental manipulations and/or pharmacological treatments. In this study we examined the role of sonic hedgehog signaling for the external gill branching morphogenesis using an emerging model organism, Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*). We found that administration of the sonic hedgehog inhibitor SANT-1 markedly reduced the number of fine gill filaments (fimbriae), and the direction of the protrusion of the gill stems (rachises) shifted toward the anterior more than the intact ones, resulting in the radial expansion of the three pairs of the gill stems. Immunohistochemistry targeting the striated muscles revealed that the fasciculation of the gill muscles in the posterior portion within the gill stems in normal larvae was impaired after the administration of the sonic hedgehog inhibitor. Based on these results, we propose that gill primordia develop to protrude the fine gill filaments in their posterior portions in reference to the sonic hedgehog signaling-dependent antero-posterior polarity within developing gills.

Keywords: newt, larva, external gill, branching morphogenesis, sonic hedgehog, FGF

序論

脊椎動物の鰓は咽頭弓由来の構造であり、水生生物が外環境から酸素を取り入れるために必要な呼吸器官である。魚類の鰓は咽頭部の膨出とそれに応じた体表の陥入によって形成され、左右に 5-7 対ある鰓裂と呼ばれる開口の境界には咽頭嚢、そして鰓弓が発達する。各々の鰓弓の外側には多数の細かなひだである鰓弁が 2 列に並び、ここがガス交換の場となる。軟骨魚類では、その一部を除き、各鰓弓の鰓弁の間に鰓隔膜が介在し、これが長く伸び体表まで達することで複数の鰓孔を形成する。硬骨魚類においては鰓隔膜は退化し、鰓が収納される鰓腔の外側を鰓蓋が覆って 1 つの鰓孔を形成、鰓は内在化する¹⁻⁵⁾。

両生類において鰓は主に幼生期でみられる。無尾両生類の場合、例えばアフリカツメガエル *Xenopus laevis* は st. 23 までに鰓部が顎から溝によって完全に分離したのち、個々の鰓がおそらくは細胞増殖の主導によって突出をする。伸長した鰓は st. 37/38 には分枝し始めるが、st. 42 に鰓蓋形成が始まってからは内鰓化する⁶⁾。一方で有尾両生類の鰓は内在化せず、変態によって鰓を消失するまでは外鰓を持つ(図 1)。有尾両生類イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* は st. 27 で鰓部が 3 対の鰓原基に応じた隆起に分かれ、st. 30 で突出し、両側面の斜め後方へと

伸長を始める。st. 31 以降には血液循環を伴いながら外鰓の発生が進み、st. 33 で外鰓主枝 (rachises) の後方で細く長い細枝 (fimbriae) の形成が始まり、細枝はその数を増やしていく (図 2)⁷⁾。鰓が内在化する真骨魚類や無尾目両生類とは異なり、鰓が外鰓として外側に突出するイベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* の外鰓の様態は、人工淡水内での顕微鏡観察により実験室内で容易に長期間の観察が可能である。

肺の複雑な形態形成は、上皮と間充織の相互作用により成り立つ

一方、私たちヒトは肺呼吸をする動物である。肺の原基は、内胚葉と内臓中胚葉 (visceral mesoderm) からなる消化管前腸部の食道・呼吸器形成領域の腹壁の憩室として出現する。そして内胚葉由来の呼吸上皮の起源組織と、それを覆う内臓中胚葉由来の間充織は左右に膨出し、マウス胚においては 9.5 dpc (交授後 9.5 日目) で肺芽を形成する。その後、pseudoglandular stage (偽腺 (状) 期) と呼ばれる 9.5–16 dpc に肺芽の伸長ならびに肺上皮の最初の細枝が生じ、以降の canalicular stage (管状期) と次の saccular stage (嚢状期) と呼ばれる時期には、複数回の分枝と終末部での毛細血管の並置が生じ、機能的な肺へと発達する⁸⁾。

この肺の形態形成には上皮と間充織の相互作用が関わっている。肺の器官形成期の胎仔では、気管の

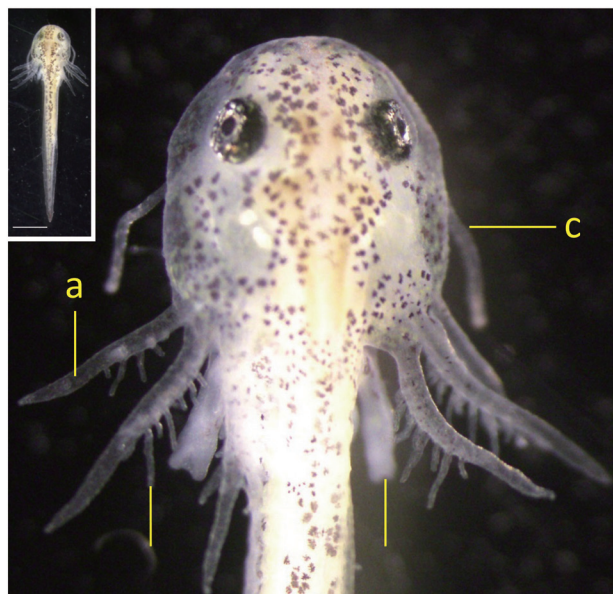


図 1. イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* 幼生 (st. 37) の正常発生個体の頭部写真。左右 3 対の外鰓主枝 (a) の後方からは多くの細枝 (b) が形成される。外鰓よりも前方には平衡を保つためのバランス (c) が形成され、胴体部前方からは前肢 (d) が発達する。呼吸器官である外鰓の形態形成は人工淡水中で非侵襲的に観察可能であり、哺乳類の肺が子宮内の胎仔の深部で発生するのとは対照的である。Bar, 2mm.

周辺の間充織は肺上皮先端部の成長と分枝を抑制する一方、気管の上皮は、肺の先端間充織との相互作用により、分枝形成が誘導されることが移植実験により示されている⁹⁻¹¹⁾。

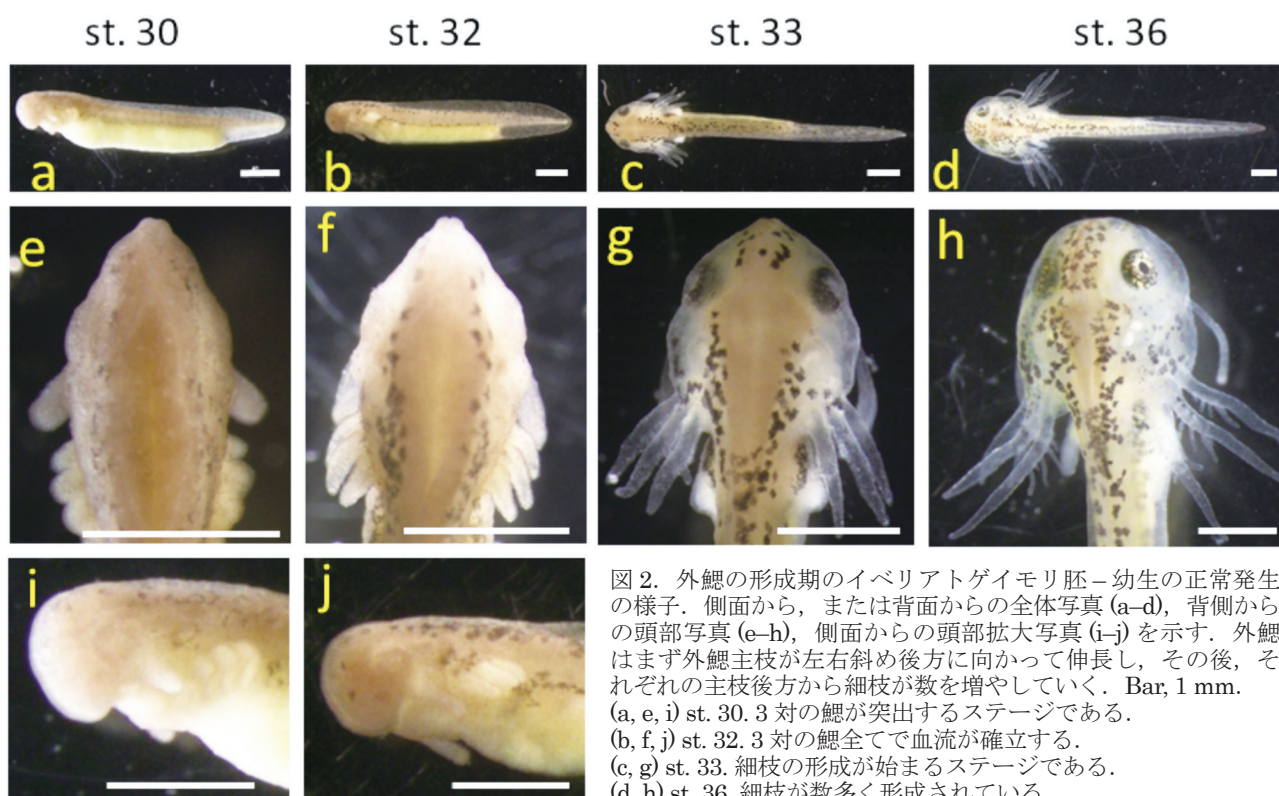


図 2. 外鰓の形成期のイベリアトゲイモリ胚-幼生の正常発生の様子。側面から、または背面からの全体写真 (a-d)、背面からの頭部写真 (e-h)、側面からの頭部拡大写真 (i-j) を示す。外鰓はまず外鰓主枝が左右斜め後方に向かって伸長し、その後、それぞれの主枝後方から細枝が数を増やしていく。Bar, 1 mm. (a, e, i) st. 30. 3 対の鰓が突出するステージである。 (b, f, j) st. 32. 3 対の鰓全てで血流が確立する。 (c, g) st. 33. 細枝の形成が始まるステージである。 (d, h) st. 36. 細枝が数多く形成されている。

哺乳類の肺原基において、上皮間充織相互作用を主に仲介するのはペプチド性シグナル伝達分子である。例えば、FGF10（繊維芽細胞増殖因子 10）は肺原基中胚葉（肺間充織）に特異的な発現をする。*fgf10* がノックアウトされたマウス胎仔では肺芽が形成されないことが報告されている¹²⁾。また、肺上皮単独の器官培養系において、FGF10 を含ませた微小なビーズを単離した肺原基から少し離れたところに置くと肺上皮はビーズに向かう伸長を示し、*fgf10* は上皮の細胞増殖と細胞移動、すなわち肺上皮の間充織側への突出を促すことが示唆された。一方、*bmp4*（骨形成因子 4）は肺の先端上皮とその周辺の間充織で発現するが、*fgf10* の肺先端部間充織での発現によって誘導される。複雑なことに、この肺上皮の単離培養系において、FGF10 によって誘導された BMP4 は FGF10 の作用を抑制するフィードバック的な働きを持つことが示されている。このように、肺間充織に局所的に発現する FGF10 が隣接する上皮の伸長を誘導し、後述のように BMP4 や他の分泌因子である Wnt や Shh とともに遺伝的カスケードを形成することで、正確な分枝が制御される^{13,14)}。

マウス肺上皮に発現する *shh* は、有尾目外鰓でもその形態形成に役割を担うか

bmp4, *fgf10* に加えて、マウスの肺上皮には *sonic hedgehog (shh)* が発現し、特に肺上皮の終末部先端で強い発現を示すことが知られている^{14,15)}。肺の器官培養系において Shh を投与すると肺間充織での *fgf10* 発現が抑制される。肺の先端上皮で発現する *surfactant protein-C (SP-C)* のプロモータ領域を用いて肺上皮終末部で *shh* を過剰発現させると、間充織細胞の増殖が増加し、それに付随した上皮拡張の欠落が生じたことが報告されている¹⁶⁾。一方 *shh* をノックアウトしたマウスでは、気道と消化管が瘻孔様の融合を伴って不分離となり、更には肺葉形成の欠落、上皮の分枝形成の欠落等の表現型が生じたことが報告されている¹⁷⁾。また *shh* ノックアウトマウスにおいては、肺間充織での *fgf10* の発現がその基部側にまで拡張することから、*shh* が *fgf10* を先端間充織内に局限する可能性が示されている¹⁷⁾。

shh はショウジョウバエから見つかった *hedgehog (hh)* の脊椎動物における相同遺伝子 (ortholog) であり、脊索前板で発現することによって眼予定領域を 2 つに分けるほか、脊索、ついで神経管の底板に発現することによって細胞の運動ニューロンや介在ニューロンなどへの分化運命を決定するといったモルフォゲン（形原）としての役割を持つ。さらに四肢動物の発生の後期には肢芽において後方間充織の

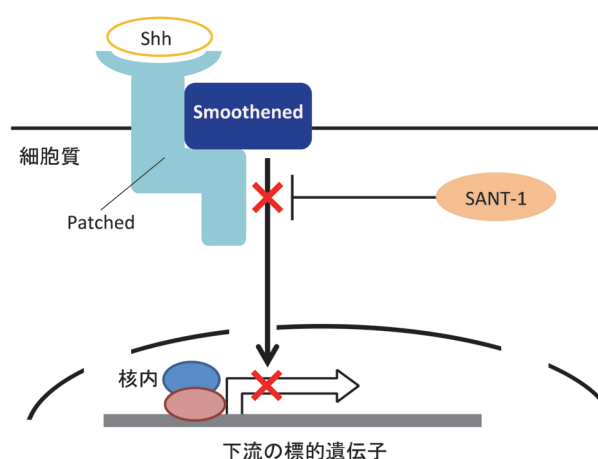


図3. Shh シグナル伝達経路と Shh シグナル特異的阻害剤 SANT-1 の作用機序の概要。本研究で阻害剤として使用した SANT-1 は、Shh 受容体である膜貫通型蛋白質の Smoothened に特異的に結合し、その働きを抑制する。Shh リガンド存在下では、下流の細胞内シグナルトランスデューサーとして機能する転写因子 Gli は核内に移行し転写活性化因子として働く。しかし、SANT-1 によって Smoothened の働きが抑制されると、Gli は転写抑制因子として働く。

領域である ZPA (zone of polarizing activity; 極性化活性帯) で働くことで、肢芽の前後軸を規定する¹⁸⁾。肢芽の指骨のパターン形成にも Shh は関与する。

Shh 分子はペプチド性の細胞間コミュニケーション分子であり、そのシグナル伝達経路は細胞膜上の受容体である Patched に受容されることで機能する（図3）。Patched は Shh リガンド不在下では 7 回膜貫通蛋白質の Smoothened の抑制因子として働く。Shh が Patched に結合してない状態では下流の Gli は Cos2 と Fused によって微小管に繫留している。繫留された Gli は PKA と Slimb により切断 (shedding) を受け、切断された Gli は下流の標的遺伝子のシスエレメントに結合して転写抑制因子として働く。しかし Shh が Patched に結合すると Patched の立体構造が変化し、Patched と Smoothened は解離し、結果として Smoothened は抑制を解除される。Smoothened はおそらく Fused や Cos2 をリン酸化することにより Gli を微小管から解離させ、PKA と Slimb による Gli の分解を抑制する。切断されないフルサイズの Gli は核内に移行後、CBP と結合することで、下流の標的遺伝子に対して今度は転写活性化因子として働く。

ゼブラフィッシュにおいて *shh* は咽頭弓の分節前の発生段階である約 30 hpf（受精後 30 時間後）から咽頭内胚葉から派生する口腔上皮を含む咽頭上皮で広く発現する。*Xenopus laevis* においても脊索や中枢神経系の腹側領域のほか、咽頭弓で発現がみられることが知られている¹⁹⁾。

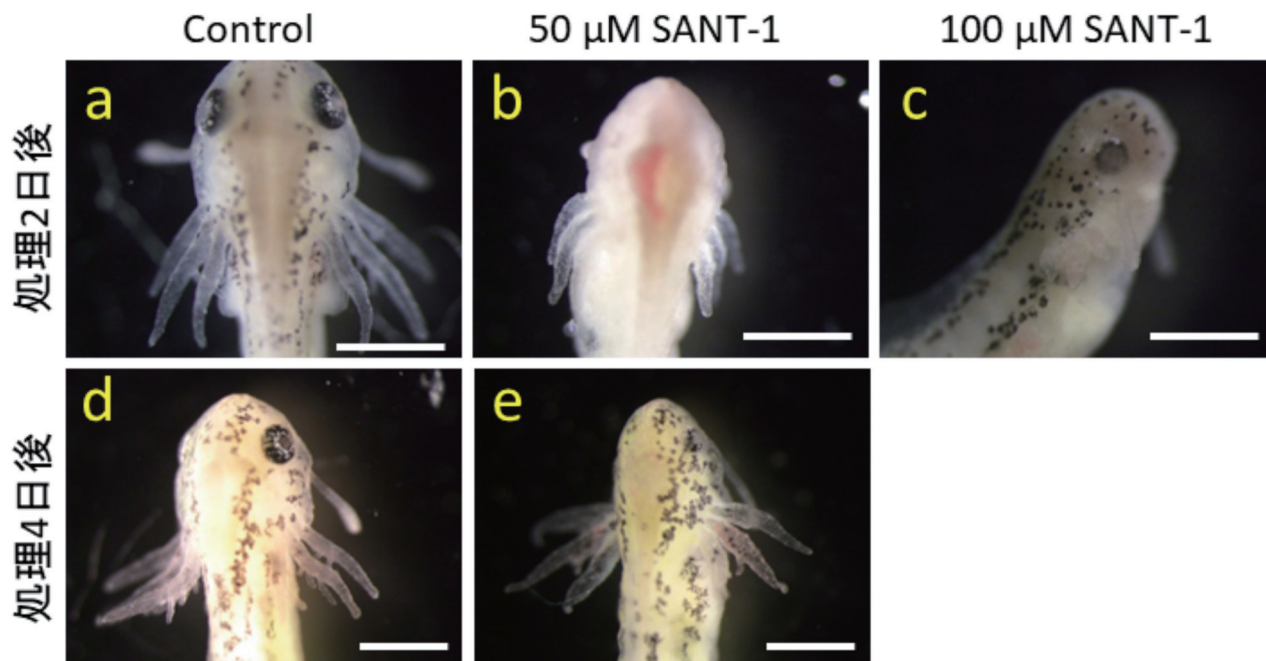


図 4. 外鰓伸長期から Shh シグナル伝達経路特異的阻害剤 SANT-1 を投与したイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化. Bar, 1 mm. SANT-1 を外鰓伸長期の st. 30 から 2 日間、幼生に投与し、2 日後 (b, c) と 4 日後 (e) に撮影した。実験を通じて 24℃ で飼育した。

(a, d) 対照群となる 1% DMSO (中間溶媒) のみで処理した同腹幼生. (b, e) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生. 外鰓主枝の伸長がやや抑制された. 外鰓主枝は太く形成され、より前方に向かって伸長し、結果的に放射状に形成された. 鬱血が外鰓や頭部で見られたほか、細枝数の大幅な減少が見られた. (c) 100 μ M SANT-1 処理後の幼生. 外鰓の伸長の抑制がさらに強く表れた. この濃度の処理では、全ての処理個体が 3 日後には死亡した。

イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* は 20 世紀半ばに発生段階表が発表された²⁰⁾。その後の発生段階表の改訂⁷⁾を経つつ、*Pleurodeles waltl* は、四肢再生研究等において、古くから実験発生学的研究に用いられてきた古典的なモデル有尾両生類である。しかし有尾目の外鰓の形態形成に関する研究はほとんど行われておらず、未解明な点が多い。また、有尾目の外鰓における *shh* の発現パターンは知られていない。本研究は *Pleurodeles waltl* の外鰓の形態形成について、特に Shh 経路に焦点を当ててその役割を解明することを目的とした。外鰓形成期の *Pleurodeles waltl* 胚を Shh 経路の特異的な阻害剤に暴露することによってその影響を調査した。得られた実験結果をもとに、有尾目両生類外鰓の形態形成における細胞間コミュニケーション分子である Shh の役割について議論する。

更に、イベリアトゲイモリ外鰓の形態形成に阻害剤が及ぼす薬理活性のスクリーニングの過程で、FGF シグナル伝達経路阻害剤として有名な SU5402 に鬱血等をもたらす作用を見いだしたので、これについても報告する。上述のように肺において、また唾液腺においても、FGF はそれらの上皮の分枝形態形成において主導的な役割を担う分子である^{21, 22)}。有尾目の外鰓において FGF シグナル伝達経路の果た

す役割についても考察の項で議論した。

材料と方法

実験動物

実験材料であるイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) 胚は、雌雄の成熟個体を同一水槽内に入れ、ペアリングをすることで得た。得られた胚は 2.5% メルカプト酢酸ナトリウム (チオグリコール酸ナトリウム, pH9.0; FUJIFILM-Wako) 水溶液で脱ゼリーし、人工淡水 (10% Steinberg 氏液) 中で 16–24℃ で飼育し、目的の発生段階になるまで発生させた。発生段階は Shi and Boucaut (1995) の発生段階表により同定した⁷⁾。

免疫染色に用いるサンプルは 4% ホルマリン / リン酸緩衝液 (PBS) により固定し、使用するまで 4℃ で保存した。

イベリアトゲイモリ胚の SANT-1 への暴露

Shh 経路の阻害剤として SANT-1 [(4-Benzyl-piperazin-1-yl)-(3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)-amine](C₂₃H₂₇N₅, MW 373.49, CAS Number 304909-07-7, Sigma-Aldrich) を用いた (図 3)。SANT-1 は膜貫通型蛋白質である Smoothed を阻害することで Shh 経路の働きを抑制する。

SANT-1 を両親媒性分子である DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解したのち、DMSO が終濃度 1% 未満かつ SANT-1 が目的の濃度になるまで人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で希釈した。この操作により、100 μ M と 50 μ M の SANT-1 溶液を作成した。これらの濃度は我々の先行研究で使用され、実際に効果が得られた条件をもとに決定した。Organ culture dish 内に SANT-1 溶液を 2 mL 分注し、さらに st. 30 または st. 32 まで発生させたイベリアトゲイモリ胚を 8 個体ずつ投入した。また、1% DMSO/人工淡水による処理を対照群とした。これらの胚を 24°C インキュベータ内の湿箱に置き、40 rpm 程度で 2 日間振盪したのち SANT-1 処理の影響を観察した。観察後、他の器官への影響を避けるために洗浄し、6 穴プレート内の人工淡水に処理胚を移行した。その後さらに 2 日経過した処理開始後 4 日目に SANT-1 処理の影響を再び観察した。

12/101 抗体による筋肉の免疫染色

免疫染色用に固定したサンプルを 100% メタノールに置換し、5 分間振盪した。これを 2 回繰り返した。その後 75%、50%、25% のメタノールを含む PBST (0.1% Tween20/PBS) に順に置換、各々 5 分間振盪してから PBST に置換し 5 分間、2 回振盪することで水和した。3% スキムミルクを含む PBST 中に 1 時間静置したのち 100 倍希釈した 12/101 抗体と 3% スキムミルクを含む PBST によって一次抗体反応を 4°C で一晩行なった。翌日 PBST により 20 分間 5 回の振盪しながら洗浄したのち、3% スキムミルクを含む PBST 中に 1 時間静置し、200 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体と 3% スキムミルクを含む PBST によって二次抗体反応を 4°C で一晩行なった。翌日 PBST による 20 分間 5 回の振盪と PBS による 5 分間 2 回の振盪で洗浄した。

抗リン酸化ヒストン H3 抗体による免疫染色

一次抗体として抗リン酸化ヒストン H3 (PHH3) 抗体を、二次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。一次抗体、二次抗体共に 50 倍希釈とし、12/101 抗体による免疫染色と同様の工程で染色した。

イベリアトゲイモリ胚の SU5402 への暴露

FGF 経路の阻害剤として SU5402 [3-[4-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrol-3-yl]-propionic acid] ($C_{17}H_{16}N_2O_3$, MW 296.32, CAS Number 215543-92-3, TOCRIS) を用いた。DMSO に溶解した SU5402 を SANT-1 処理

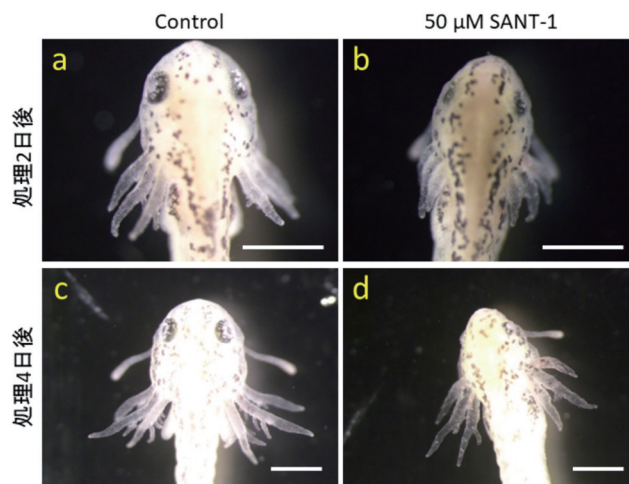


図 5. 細枝形成直前の発生段階から Shh シグナル伝達経路特異的阻害剤 SANT-1 を投与したイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化。Bar, 1 mm. SANT-1 を細枝形成直前の st.32 から 2 日間、幼生に投与し、2 日後 (b) と 4 日後 (d) に撮影した。実験を通じて 24°C で飼育した。(a, c) 対照群となる、1% DMSO (中間溶媒) のみで処理した同腹幼生。(b, d) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生。細枝数の減少が顕著である。それでも形成された細枝は対照群と同程度に長い。st.30 からの投与の場合と同様に、外鰓の伸長の抑制や放射状の外鰓主枝の形成、外鰓での鬱血が観察される。ツメガエル胚やニワトリ胚などでは *shh* が発現することが知られる前肢芽は、低形成となった (ほとんど見えない)。

と同様に人工淡水で希釈し、25 μ M と 50 μ M の SU5402 溶液と、対照群として 1% DMSO/人工淡水を作成した。これらの溶液に st. 30 のイベリアトゲイモリ胚を SANT-1 処理と同じ工程で浸漬し、観察を行った。

結果

イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* 幼生の外鰓の形成機構を理解するために、外鰓形成期の胚をシグナル伝達経路特異的な阻害剤に暴露し、その影響を観察した。Shh 阻害剤の SANT-1 により、高い再現性で外鰓細枝の欠落の表現型が得られた。この表現型を研究上の出発点としてさらに分析をし、外鰓の構造の形成にかかわるシグナル経路の役割を調査した。

st. 30 からの Shh 阻害剤 SANT-1 の投与

外鰓伸長期のイベリアトゲイモリ胚 (st. 30) を Shh 経路を抑制する SANT-1 に 2 日間浸漬し、その影響を調べた。この時、対照群は中間溶媒の DMSO のみで処理した。対照群が st. 33 に達した時、対照群と比較して実験群の鰓は太く短く形成された (図 4)。この低形成は 100 μ M SANT-1 の実験群で特に強く、外鰓はほとんど伸長しなかった (図 4c)。また、鬱血のような状態が鰓や頭部にみられ、網状に赤くな

る個体がみられた。

浸漬開始 2 日目の観察後、処理幼生を洗浄し人工淡水中に移行し、さらに 2 日後の浸漬開始から通算で 4 日目に再度観察を行った。100 μ M の実験群は洗浄の翌日に死亡したため、50 μ M の実験群と対照群の比較となった。この時の対照群は st. 34/35 に達していた。実験群の外鰓主枝は対照群と同程度の長さか、それより短く太く形成された (図 4 e)。さらに外鰓主枝はより前方に向かって突出し、3 対の外鰓の配置は放射状となった。浸漬開始 2 日目と同様、鬱血が外鰓や頭部で見られた。対照群では細く長い細枝が腹側後方に多く形成されていたが、実験群の細枝は少なく、また短縮していた。

st. 32 からの Shh 阻害剤 SANT-1 の投与

前項の st. 30 からの浸漬処理によって、外鰓の細枝の数が減少したことから、Shh 経路が細枝の形成に関わるのではないかと考えた。そこで細枝が出現し始める直前の発生段階である st. 32 のイベリアトゲイモリ胚を SANT-1 に浸漬しはじめ、2 日後に洗浄をし、浸漬開始から 2 日目と 4 日目に観察を行った (図 5)。SANT-1 を溶解した中間溶媒である DMSO のみによる対照群の発生段階は 2 日目には st. 33/34 に、4 日目には st. 35/36 に達していた。実験群では、2 日目の時点で st. 30 からの処理と同様、太く短い鰓を形成し、一部は鬱血を生じていた。4 日目には、ほとんどの個体で細枝が形成されていなかった。細枝が少数形成されている個体でも、各鰓に 1 本生えている程度であった (図 5 b, d)。さらにこの時形成された細枝の形成位置は、対照群の外鰓細枝の位置と比較すると、主枝の最も先端部側または最も基部側に生える細枝の位置に相当していた (図 5 d)。一方で生き残った細枝の長さは、個体差はあるものの、対照群の同箇所のそれとほぼ同じであった。これらの結果から、Shh 経路は細枝形成において、細枝の伸長ではなく形成開始に関わることが強く示唆された。その他の影響としては、肢芽の形成の抑制が観察されたほか、小眼や体の背側への屈曲も観察された。

リン酸化ヒストン H3(PHH3) 抗体による細胞増殖領域の調査

外鰓の細枝の形成は局所的な細胞増殖に依存するかどうかを調査するために、細胞分裂期のマーカーとなる PHH3 の抗体を用いて whole-mount で免疫染色を行った。その結果、陽性シグナルは外鰓を含む全身で見られ、この抗体がイベリアトゲイモリ胚に交差することが示された (図 6 a)。

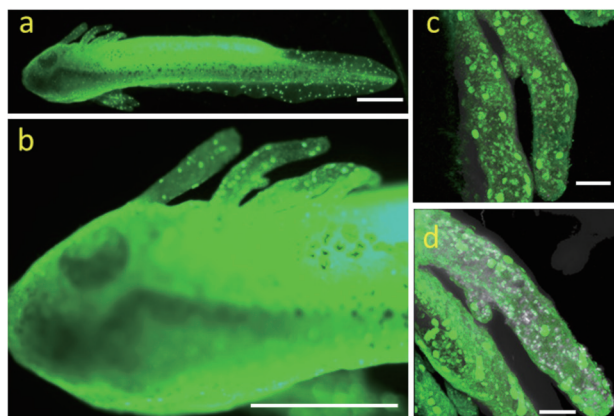


図 6. イベリアトゲイモリ幼生 (無処理で正常発生した個体) の分裂期の細胞の局在を示す、抗-PHH3 抗体による免疫染色像。蛍光実体顕微鏡 (a, b) または共焦点レーザー顕微鏡 (c, d) により観察した。枝分かれの先端や枝分かれが形成される予定の箇所で細胞増殖が盛んであると予想したが、実際の観察像はそうには見えない。(a, b) 全体像 (a) と頭部拡大図 (b)。Bar, 1 mm。(c, d) 鰓部拡大図。形成途中の細枝の分枝が見える。Bar, 100 μ m。

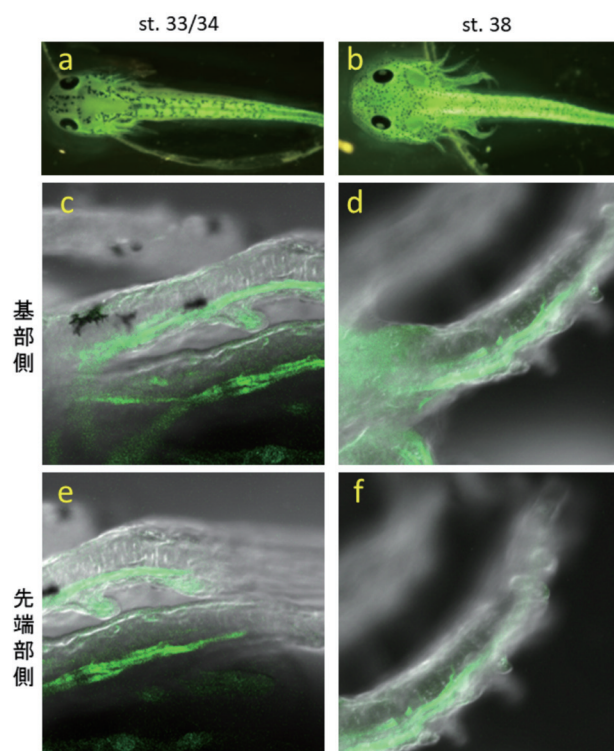


図 7. 正常発生した無処理のイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓における筋肉の分布。st. 33/34 または st. 38 で固定した無処理の幼生の筋肉の分布を、骨格筋を染める 12/101 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡 (a, b) と共焦点顕微鏡 (c-f) で観察した。(a, c, e) st. 33/34 幼生。筋肉は主枝の中で、細枝が形成される後方に偏って形成されている。形成途中の細枝の中にもシグナルが見えることがあった。(b, d, f) st.38 幼生。st. 33/34 の個体の場合と同様に、筋肉は後方に偏って形成されている。

st. 33/34 の外鰓において細胞増殖を示すシグナルは鰓全体に一樣に見られた (図 6 b)。この発生段階は外鰓の細枝の形成が始まり、その数を増やしていく発生段階である。しかしながら、予想に反して細枝の突出の先端または付け根に集中した増殖シグナルは見られなかった (図 6 c, d)。また細枝は外鰓主枝の腹側後方に形成されるが、主枝の側にも、その後方領域に特異的にシグナルが集中した様子もなかった (図 6 b-d)。よって細枝の形成は細胞増殖のみに拠るのではなく、表皮細胞の変形や再配列の要素も含めた形態形成運動の産物であることが示唆された。

12/101 抗体を用いた免疫染色による筋肉の分布の調査

Shh 経路は筋形成に関与することが知られている。正常発生ではやや後方 (尾側) に向けて突出する外鰓主枝が、本研究の SANT-1 処理においては、前方 (頭側) にも拡がり放射状に形成された。SANT-1 処理幼生では、Shh 経路が阻害されたために主枝の筋形成に異常が生じて放射状に突出したのではないかと考え、それを検証するために筋肉に対する抗体を用いた免疫染色を SANT-1 処理幼生に施した。用いた 12/101 抗体は骨格筋に結合し、平滑筋と心筋には結合しない抗体で、おそらく筋小胞体の膜構成要素をエピトープとして認識するとされる。12/101 抗体は間充織細胞には交差しない。

免疫染色の結果、無処理胚の筋肉のシグナルは各外鰓主枝の後方に位置する筋組織で見られ、内部の紡錘状の細胞群 (これらは主枝に対して長軸方向を直交するように配向する) には見られなかった (図 7)。このことからイベリアトゲイモリの形成期の外鰓の筋肉は、後方に偏って位置していることが分かった。さらに細枝の中にも一部のシグナルは見られたが、細枝の先端の表皮にはシグナルは見られず、筋肉は外鰓の最も先端部分にも分布していなかった (図 7 e, f)。主枝の中の筋肉組織の分布に関して、これらの観察結果は st. 33/34 と st. 38 の双方の発生段階の幼生で共通して得られた。

SANT-1 投与後の幼生での筋肉の局在分析

次に、筋肉を染める 12/101 抗体による免疫染色を、st. 30 から SANT-1 処理した個体に適用し、SANT-1 投与の筋形成への影響について調べた (図 8)。その結果、実験群では対照群と比較して筋形成領域がより前方にも拡がり、1 本の密な筋肉帯としてではなく、間隙の目立つ細網状に形成された (図 8 b, d)。しかしながら、筋肉の外鰓の後方への偏りは概ね維

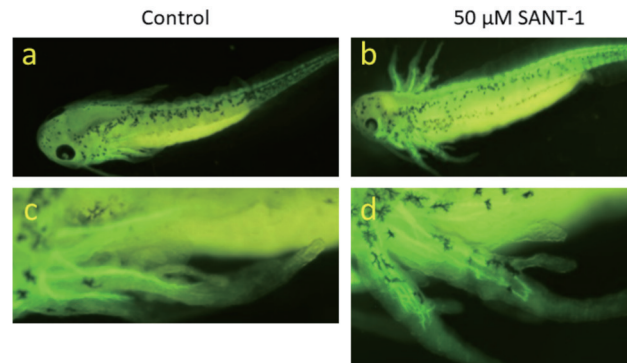


図 8. SANT-1 投与後のイベリアトゲイモリ幼生の、筋肉の分布の変化. st. 30 から SANT-1 処理を 2 日間行い、その 2 日後に固定したサンプルに対して、骨格筋を染める 12/101 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(a, c) 1% DMSO 処理 (中間溶媒のみ) の同腹幼生の、全体像 (a) と鰓部の拡大図 (c)。(b, d) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生の、全体像 (b) と鰓部の拡大図 (d)。対照群に比べ、SANT-1 投与群の鰓部の筋肉は、外鰓の前方寄りにも形成領域を広げ、なおかつ網目状に形成されている。

持されたままであった。これらの結果から、Shh が外鰓において筋形成領域を後方に制限する働きを持っていたところに、SANT-1 の阻害効果によって Shh の筋肉への後方局在化作用が弱まることで、処理群の外鰓では前方に筋肉形成領域が拡大したと考えられる。

st. 30 からの FGF 阻害剤 SU5402 の投与

イベリアトゲイモリ胚を FGF の阻害剤である SU5402 を含んだ人工淡水に st. 30 から 2 日間浸漬し、SANT-1 処理の場合と同様に経時変化を観察した (図 9)。その結果、浸漬 2 日目の時点で腹部には水泡化が見られ、ヒレには白い縁取りができて体長が短くなった。外鰓は背側に反り返っていた。濃度効果については、最終濃度 25 μ M SU5402 の実験群より 50 μ M の実験群の方が重篤な症状を示した (それぞれ、図 9 b, e, g と図 9 c, f)。この時の対照群の発生段階である st. 33 は、外鰓内部の血流が 3 対の外鰓全てで確立されている時期である。しかし実験群では 25 μ M, 50 μ M 処理群の双方で血流が観察されなかった。そして鬱血が観察された。一方で、外鰓の細枝は生じていた (図 9 g)。

SU5402 を含まない人工淡水に移行して 2 日後の、処理開始から通算 4 日目の観察でも血流は回復していなかった。また、細枝は突起程度であり、同じ st. 34/35 の同腹対照群のような細く長い細枝は見られなかった。SU5402 のその他の影響としては、処理開始 2 日目と同様に処理開始から通算 4 日目の観察でも、腹部水泡化、ヒレでの白い縁取り、体軀の短縮が見られた。外鰓の背側への反り返りも観察され

たが、25 μ M 実験群ではほとんどの個体で回復していた。また、SU5402 洗浄後の 4 日目、すなわち処理開始から通算 6 日目には、実験群の個体はすべて死亡した。

討論

分枝構造は肺上皮や唾液腺、乳腺など多くの器官においてみられる構造であり、特にマウス胎仔のこれらの原基の器官培養系を用いてその形態形成の研究が行われてきた。その分野は長い研究の歴史があり、胎仔内の奥深くで発生する肺原基や唾液腺原基の形態形成を可視化するために、これらの原基の上皮のみの単独培養などの方法が確立されている²³⁾。これまでの報告により、肺上皮の分枝形態形成は、主にペプチド性シグナル分子を介した、上皮とその周囲の間充織との間の相互作用によって進むことが解明されてきた。本研究で注目し研究材料としたイペリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* の幼生の外鰓も、分枝構造としてその腹側後方に多くの細枝を持つ。外鰓はその名の如く外側に突出した構造であるので、人工淡水中で飼育しながら、長期間にわたる経時的な器官形成の観察が可能である。イペリアトゲイモリ初期胚を用いた原腸形成運動などの古典的研究は一定数あるが、対照的に、外鰓の形態形成、特にそのシグナル経路の解明を志向した研究はほとんどない。本研究は、イペリアトゲイモリの外鰓が、分枝形態形成する器官における特定のシグナル伝達経路の役割を長期にわたり非侵襲的に調べるための新しいモデルになる可能性を示した。

Shh 経路特異的阻害剤 SANT-1 実験の実験結果についての考察；外鰓の細枝の分枝形成は Shh 経路依存的か

神経堤細胞の細胞移動やそれらの分化をコントロールするシグナル伝達分子は、脊椎動物の頭部発生や、鰓を生み出す胚性器官である咽頭弓を含めた咽頭領域の分節性に富んだパターンニングに重要である²⁴⁻²⁷⁾。神経堤細胞は、遊走前の前後－背腹軸に沿った出現位置により特異的なコミットメントを受け、更に移動経路の微小環境との相互作用の影響も受けて、その後の分化運命が特定化されてゆく。そのような神経堤細胞像は、Dr. Nicole LeDouarin らのグループによるノーベル賞受賞研究となる、ニワトリ胚とウズラ胚間の交換移植によるキメラ実験によって創始された²⁸⁾。頭部神経堤細胞を特定化する転写因子はおもに菱脳において発現するホメオボックス遺伝子 (*hox* 遺伝子) であり、神経堤細胞が遊走することによってその経路特有の位置情報が咽頭弓にホーミン

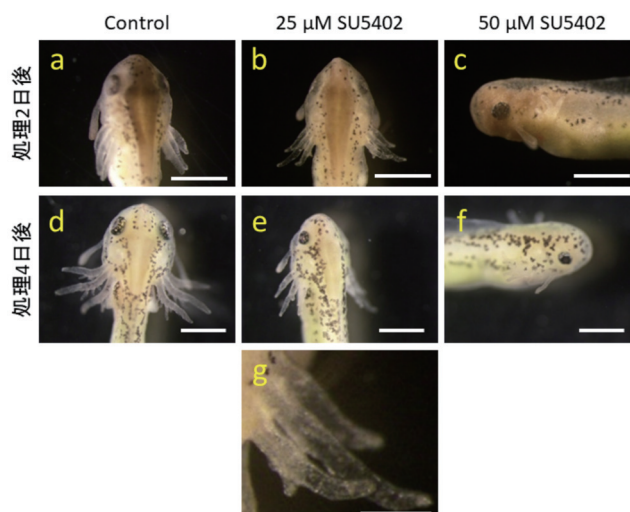


図 9. FGF シグナル伝達経路抑制剤 SU5402 を投与したイペリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化。SU5402 を外鰓伸長期の st. 30 から 2 日間幼生に投与し、2 日後 (b, c, g) と 4 日後 (d, e, f) に撮影した。実験を通じて 24°C で飼育した。

(a, d) 1% DMSO 処理の同腹幼生。

(b, e) 25 μ M SU5402 処理幼生。主枝の形、太さと長さは対照群と大きな相違はない。小眼が生じている。

(c, f) 50 μ M SU5402 処理幼生。主枝が背側に跳ね上がるように反っている。小眼も生じている。

(g) 25 μ M SU5402 処理 2 日後の幼生の主枝の拡大図。血流が観察されず血管もない。

Bars, a-f, 1 mm; g, 250 μ m.

グする神経堤細胞に伝達される²⁹⁻³⁴⁾。ゼブラフィッシュ胚において咽頭内胚葉で発現する *shh* は、神経堤細胞と口蓋外胚葉の間に相互に伝達される誘導シグナルを仲介する役割を果たす³⁵⁻³⁶⁾。その後、内胚葉の移植実験によって、咽頭弓の間充織から分泌される Shh が直接内胚葉にシグナル伝達することで咽頭弓の初期の形態変化が生じることが示された。さらに、内胚葉から神経堤由来間充織へのシグナリングによって、咽頭弓での背腹マーカーの適切な発現が確立される³⁷⁾。内胚葉からの誘導シグナルに対する神経堤からの応答が咽頭領域での *shh* の遺伝子発現を維持することが、神経堤の移植実験により示されている³⁷⁾。

これらの先行研究を元に、SANT-1 投与群の外鰓の形態形成の変化について考察する。まず、SANT-1 を含む人工淡水への浸漬により、外鰓主枝や細枝に影響が生じたことから、Shh は有尾目において、外鰓の形態形成とその内部の組織形成に関与していることが強く示唆された。*shh* は四肢動物の前後肢において肢芽後方の間充織領域である ZPA で発現する^{18, 38)}。ZPA を肢芽前方の間充織中に移植すると鏡像肢が形成されることが古典的な ZPA 領域の移植実験から知られており、これは肢芽の前後軸についての軸性が前方 (A) から後方 (P) へ P-A-P と鏡像的に反

復されたことの反映であると考えられている³⁹⁾。これと同様の鏡像肢形成が、本来 *shh* を発現しない肢芽前方間充織において *shh* 遺伝子のみを単独で過剰発現させた場合でも生じた¹⁸⁾。これらの実験から、*shh* が肢芽の後方間充織で ZPA の活性を仲介し、肢芽の前後軸を規定することが解明されている。また、この *shh* 発現は肢発生の初期に限定された一過性のものである。無尾目両生類のアフリカツメガエルにおいても、Shh が肢芽の軸性のパターンの特定化に関わることが、ツメガエル後期幼生における正常な後肢、切断して 180 度回転後に再結合した後肢、ならびに再生中の後肢での *shh* 発現の解析から示唆されている⁴⁰⁾。本研究の SANT-1 処理によって、外鰓において後方特異的な構造である細枝が減少した(図 4 と図 5)。このことは、肢芽形成の場合と同様に、*shh* が外鰓においても前後軸に沿ったパターン形成に関与する可能性を示し、これが抑制されることで細枝がなくなった可能性が考えられる。また、処理開始の発生段階を st. 32 に遅らせての SANT-1 投与では、外鰓のほとんどの細枝形成を抑制したが、それでも生き残り形成された細枝は対照群の同箇所の細枝と同程度の長さであった(図 5d)。このため *shh* は、細枝形成においてその長軸方向の伸長に関与するのではなく、細枝の形成の開始場所の指定や、細枝形成するように主枝後方の表皮ないし間充織を運命づけるような役割を果たすことが示唆された。恐らくは、細枝形成するか否かの予定運命の選択には臨界期があり、そのタイミングまでに成長抑制を免れた細枝のみが *shh* 発現あるいは Shh 経路依存的に分枝形成を開始し、あとは比較的正常に伸長をするようである。後期肢芽の指骨の形や *hox* 発現を調べた研究において、Shh は四肢形成後の指のパターンを指定するという報告がある。*shh* の役割において、肢芽全体と指の関係、外鰓全体と細枝の関係を見比べると、本研究で示唆される内容と上記の四肢形成の研究の結論とは良い対応関係を示している。更に詳細に見ていくと、SANT-1 処理をくぐり抜けて形成された少数の細枝は、外鰓主枝の基部先端部軸に沿った両端のいずれかに位置していた(図 5d)。基部側または先端部側のいずれかから、軸に沿って順に細枝が形成される可能性が考えられる。

SANT-1 処理において短くなった外鰓主枝はやや太く形成されていた(図 4 と図 5)。このことは、SANT-1 は外鰓の細胞増殖活性にはあまり影響せず、実験群と対照群の間で外鰓主枝の細胞数はそれほど変わらないことを示唆しているのかもしれない。今後は、外鰓を構成する細胞、特にその表皮細胞が基部先端部軸方向に伸張することが、どの程度外鰓の

形態形成に寄与するのかを評価する実験を組む必要がある。その一つの方策として、外鰓表皮の細胞境界を F-actin 特異的に結合する蛍光標識 Phalloidin で染色し、外鰓表皮細胞の頂端側から見た上皮形態を定量することを計画している。

分裂期細胞マーカーのリン酸化ヒストン H3 抗体による外鰓の免疫染色像について

クロマチンを構成するヒストンは、その tail 部分のアミノ酸残基がメチル化やアセチル化などの化学修飾を受けることで構造変換し、その結果クロマチンが局所でリモデリングされ、局所の遺伝子領域の転写活性が調節される。ヒストン H3 の 10 番目のセリンや 28 番目のセリンがリン酸化を受けることで、クロマチン凝縮や細胞分裂が生じる。本研究で使用した PHH3 抗体(抗・リン酸化ヒストン H3 抗体)は、セリン 10 残基かセリン 28 残基がリン酸化された時にのみヒストン H3 に結合し特異的に検出される抗体であり、これらのリン酸化は細胞分裂の際のクロマチン凝縮のフェーズで特に盛んになることから、分裂期の核のマーカーとなる。一方、これらのリン酸化は間期には殆ど生じないので、信頼性の高い細胞周期マーカーだといえる。

PHH3 抗体を用いた外鰓の免疫染色像は、外鰓全体で一様なシグナルを示していて、細胞分裂が外鰓の特定の領域に集中してるとは言えない染色像ばかりが得られた(図 6)。従って、筆者らの研究当初の作業仮説とは反対に、細枝の形成は集中的な細胞増殖によるものではないことが示唆された。マウス肺上皮において分枝芽が形成されるまでの間、分枝が形成する領域とされない領域の間の細胞増殖率の差は見られず、分枝形態形成は細胞増殖パターンの差異が原因となるのではないことが報告されている²¹⁾。本結果は外鰓の分枝が肺上皮と類似した形成メカニズムを持つ可能性を示す。今後、外鰓を構成する細胞の移動や変形にも着目し、分枝形成の引き金となるイベントの解明を行いたい。また、PHH3 抗体による免疫染色は、当然のことながら、固定サンプルにしか適用できない。生きたままの状態に分枝構造が観察できるという外鰓の特徴を生かし、今後はライブイメージングを行う必要がある。そのためにはヒストンに GFP タグをつけたトランスジェニックイベリアトゲイモリの作出が必要である。近年、有尾目のイベリアトゲイモリやアカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* においてはトランスジェニック技術が確立されている^{41, 42)}。有尾目の研究の発展を後押しする成果として、最近、メキシコサンショウウオ *Ambystoma mexicanum* のゲノムが解読され⁴³⁾、発

生生物学的、進化生物学的研究に必要な遺伝情報の基盤的リソースになるとして期待される。今後、メキシコサンショウウオを外鰓研究に積極的に取り込むことを視野に入れ、様々なシグナル伝達経路の外鰓形成における役割の研究に拡張し、本研究のこれまでの実験結果とともに、相互に比較検討したい。

筋肉がイペリアトゲイモリ外鰓の後方マーカーになることの発見と、そこに Shh 経路が関与することの発見の意義

12/101 抗体を用いた本研究において、有尾目イペリアトゲイモリ外鰓の筋肉は外鰓の後方に位置することが分かり、外鰓の軸性において後方マーカーとなることが示された (図 7)。外鰓は斜め後方に向けて突出するように形成される構造であることから、筋肉が主枝の後方に位置することで、外鰓の伸長方向を後方寄りに維持する役割を持つのかかもしれない。この見解を支持する観察結果としては、外鰓の筋肉形成領域が主枝前方にも広がった SANT-1 処理胚において、外鰓はより前方に向かった放射状の伸長を見せた (図 4e, 図 8b)。今後、外鰓の筋肉形成のみを特異的に抑制する方法を開発し、形成期の外鰓の形態形成における筋肉の役割を解明したいと考えている。筋肉組織の分泌する栄養因子 (trophic factor) ないし細胞間コミュニケーション分子が、外鰓内部の秩序だった組織構造を構築するように働いていると予想している。本研究は、内在性の Shh が外鰓での筋形成領域を後方に制限する役割を持つことを示唆したが、ゼブラフィッシュ胚やマウス胚においては *shh* が筋形成に関わることは解明されているものの、特定の器官の筋肉の大局的なパターンニングに Shh が関与することを示唆する研究はとても少なく、本研究で得られた知見には、外鰓研究の枠を超えた新しさがある。SANT-1 処理下での外鰓の筋肉は、領域が広がった分、網目状に間隙を持って形成されたため、総筋肉量は変化していないかもしれない。これを解明するために筋肉特異的な遺伝子の発現を定量する必要がある。

FGF 受容体阻害剤 SU5402 を投与した実験の結果についての考察

本研究で用いた SU5402 は FGF 受容体阻害剤として広く認知されており、そのチロシンキナーゼ活性を抑制する⁴⁴⁾。一方で、VEGF 受容体や PDGF 受容体をもつチロシンキナーゼ活性をも抑制することも報告されている。そのような阻害作用を持つ SU5402 をイペリアトゲイモリ胚に投与したところ、対照群が st. 33 となる 2 日目の時点で、投与群にお

いて外鰓の血流が全く観察されなかった。

血管は臓側中胚葉由来の血管芽細胞が分化することで形成され、その過程には FGF、VEGF、アンギオポエチンなどの因子が関わっている。外鰓での血流は st. 31 から生じ始め、st. 32 には外鰓の 3 対全てで確立する。丁度その発生段階で投与した SU5402 が、おそらくは血管形成を抑制することで、実験群の外鰓での血流の欠如を導いたと推察される。また投与開始から通算 4 日目の観察でも血流が観察されなかったことから、投与開始 2 日目の血流の欠如は単なる発生の遅延の結果によるものではないことが示された。一方、血流が確認されないにも関わらず、細枝の形成は生じた。このことから、細枝の形成は血管形成とはかなり独立しており、細枝の出芽位置で血管が広がるもしくはピンポイントで蛇行することによって細枝ができるのではないと考えている。現在、イペリアトゲイモリ幼生の血管に交差する抗体を探しているところである。そうした血管マーカー分子による免疫染色によって SU5402 処理幼生での血管の有無を明らかにする必要がある。

SU5402 処理開始 4 日目の幼生においては、対照群や SANT-1 処理の生き残り細枝で観察されたような長い細枝は観察されず、あくまで突出程度の細枝形成に留まった。これは SU5402 処理によって、細枝を構成する表皮細胞の伸長の抑制か、増殖抑制か、またはアポトーシスの促進のいずれかが生じたためと予想している。FGFR3 を過剰発現する細胞に対する SU5402 の投与は、アポトーシスを促進するという報告がある⁴⁵⁾。本研究においても今後、正常幼生や SU5402 処理幼生に対して、TUNEL 法などを適用してアポトーシスを起こした細胞の分布を把握する必要があると考えている。

総括; 有尾目発生生物学研究に対する本研究のインパクト

四肢上綱 (Tetrapoda) の脊椎動物は、体幹部から四肢を突出させるボディプランをもつ。これが一般的な陸棲の脊椎動物のイメージであろう。四肢は、その肢芽期から、背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の 3 つの軸性をもち、肢芽期においては、それらの軸性は領域特異的に発現する *hox* などの遺伝子の発現セットにもとづく組織分化のコミットメントとして、潜在的に表現されている。では、外鰓はどうか。これは一部の水生の脊椎動物が、一生のうちで一過的に形成する appendage (中軸に接続する構造物) であり、その最終的な分化形態においては、四肢と同じく、背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の 3 つの軸性をもつことは明らかである。しかしながら、(i) モ

ルフォゲン(形原)などの大局的な濃度勾配によって、その軸性が成熟していくのか、それとも(ii)肺原基や唾液腺原基のような上皮の細胞間相互作用に間充組織からの誘導シグナルが影響を及ぼす様式の、背腹軸や前後軸なしの、いってみれば基部・先端部だけの軸性しか備えない原基からの局所の相互作用の集積・総和として発生するのか、(i)なのか(ii)なのかの問題であった。本研究の実験結果の全体は、このテーゼに対して(i)を支持し、少なくとも体軸をリファレンスした軸性が形成期の外鰓にはある、という回答を与える。具体的には、本研究によって、イペリアトゲイモリ幼生の外鰓は鰓全体で軸性を持っており、それらに沿った形態形成を行うことが示唆された。イペリアトゲイモリ外鰓の細枝や筋肉は、今回の観察により、外鰓後方の構造であることが示され、前後軸に沿ったパターン形成の産物であることが示唆された。また細枝形成期のSANT-1処理により形成された細枝の位置の調査から、細枝形成の順序には、主枝の基部先端部軸に沿ったパターンがある可能性も示唆された。この後方特異的な細枝はShh経路を抑制した際には形成が抑制され、外鰓後方は前方部のような平滑な表皮を示した。このため、鰓の前後に沿ったパターンを形成する分子実体は、四肢の前後肢芽と同様に、Shhであると予想される。後方のマーカーとなる筋肉の局在もShh経路の抑制によって前方に広がったので、このことから、Shhが外鰓の前後軸を規定するモルフォゲンとしての機能を持つことが示唆された。背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の3軸に沿った形態形成をする器官としての四肢では、前後軸形成のためにZPAでShhが働き、基部先端部軸形成のためにAER(apical ectodermal ridge、外胚葉性頂堤)でFGF8やFGF4が働き、またこれらを発現する領域間で構成細胞が相互作用することで軸性の確立が進むと理解されている。本研究は、外鰓も肢芽のように軸性に基づいてパターン形成を行い内部が分化成熟する器官であるとのアイデアをもたらし、そのうち少なくとも前後軸はShhによって規定されることを示唆した。

今後は、*shh*の発現領域を同定するとともに、外鰓において背腹軸や基部・先端部軸の軸性や軸性に沿って組織分化を規定する分子群を探っていきたい。その方法論としては、例えば*in situ* hybridization法などにより幼若な外鰓先端部で特異的に発現する*fgf*のメンバーを同定し、これの発現をRNAiなどの翻訳阻害技術で特異的に抑制することでパターン形成のメカニズムを解明したい。今回の浸漬処理は胚全体でシグナル伝達経路を抑制してしまったため、より、「外鰓特異的に」特定の遺伝子発現を抑制する

方法を見いだしていきたいと考えている。

謝辞

神奈川大学理学部の小笠原強名誉教授には研究上のご助言を賜り、泉進名誉教授、大平剛教授には分子生物学の基盤的な技術についてのご助言も賜りました。感謝致します。教務技術職員の鶴岡慎哉氏、豊泉研究室の秋永薫博士、市川麗子博士には研究上の議論を重ねて頂きましたので、感謝します。研究活動ならびに研究発表の場をご提供くださいました総理研所長の川本達也先生ならびに所員各位に感謝いたします。筆頭著者である桃井環の神奈川大学理学研究科の博士前期課程への進学を後押しし、研究活動を経済面と精神面の両面から支えてくださいました父母に深謝します。

文献

- 1) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
- 2) Kimmel, CB, Miller CT and Keynes RJ (2001) Neural crest patterning and the evolution of the jaw. *J. Anat.* **199**: 105-120.
- 3) 岩井保 (2005)「魚学入門」恒星社厚生閣, 東京. pp. 123-130.
- 4) Jonz MG and Nurse CA (2008) New developments on gill innervation: insights from a model vertebrate. *J. Exp. Biol.* **211**: 2371-2378.
- 5) Schilling TF and Le-Pabic P (2009) Fishing for the signals that pattern the face. *J. Biol.* **8**(11): 101. doi: 10.1186/jbiol205.
- 6) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.
- 7) Shi DL and Boucaut J-C (1995) The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**: 427-441.
- 8) Ten-Have-Opbroek AA (1991) Lung development in the mouse embryo. *Exp. Lung Res.* **17**: 111-130.
- 9) Alescio T and Cassini A (1962) Induction *in vitro* of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J. Exp. Zool.* **150**: 83-94.
- 10) Wessells NK (1970) Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. *J. Exp. Zool.* **175**: 455-466.
- 11) Goldin GV and Wessells NK (1979) Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. *J. Exp. Zool.* **208**: 337-346.
- 12) Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N and Kato S (1999) Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.* **21**: 138-141.
- 13) Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S and Hogan BL (1999) Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung

- development. *Development* **126**: 4005-4015.
- 14) van Tuyl M, Post M (2000) From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir. Res.* **1**(1): 30-35. doi: 10.1186/rr9.
 - 15) Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T and Hogan BL (1996) Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* **122**: 1693-1702.
 - 16) Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G and Hogan BL (1997) Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* **124**: 53-63.
 - 17) Pepicelli CV, Lewis PM and McMahon AP (1998) Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.* **8**: 1083-1086.
 - 18) Riddle RD, Johnson RL, Laufer E and Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-1416.
 - 19) Koide T, Hayata T, Cho KW (2006) Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterol enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development* **133**: 2395-2405.
 - 20) Gallien L and Durocher M (1957) Table chronologique du developpement chez *Pleurodeles waltlii* (Michah) *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**: 97-114.
 - 21) Nogawa H, Morita K and Cardoso WV (1998) Bud formation precedes the appearance of differential cell proliferation during branching morphogenesis of mouse lung epithelium *in vitro*. *Dev. Dyn.* **213**: 228-235.
 - 22) Kera H, Yuki S and Nogawa H (2014) FGF7 signals are relayed to autocrine EGF family growth factors to induce branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Dev. Dyn.* **243**: 552-559.
 - 23) Nogawa H and Takahashi Y (1991) Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development* **112**(3): 855-861. doi: 10.1242/dev.112.3.855.
 - 24) Lumsden A, Sprawson N and Graham A (1991) Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**: 1281-1291.
 - 25) Schilling TF and Kimmel CB (1994) Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* **120**: 483-494.
 - 26) Sechrist J, Scherson T and Bronner-Fraser M (1994) Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. *Development* **120**: 1777-1790.
 - 27) K ntges G and Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**: 3229-3242.
 - 28) Noden DM (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev. Biol.* **96**: 144-165.
 - 29) Hunt P and Krumlauf R (1991) Deciphering the Hox code: Clues to patterning branchial regions of the head. *Cell* **66**: 1075-1078.
 - 30) Lumsden A, Sprawson N and Graham A (1991) Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**: 1281-1291.
 - 31) Couly GF, Coltey PM and Le Douarin NM (1993) The triple origin of skull in higher vertebrates: A study in quail-chick chimeras. *Development* **117**: 409-429.
 - 32) Rijli FM, Mark M, Lakkaraju S, Dierich A, Dolle P and Chambon P (1993) A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* **75**: 1333-1349.
 - 33) Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**: 191-201.
 - 34) K ntges G and Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**: 3229-3242.
 - 35) Eberhart JK, Swartz ME, Crump JG and Kimmel CB (2006) Early Hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development. *Development* **133**: 1069-1077.
 - 36) Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan Y-L, Song H, Bolin TC, K nerth AK, Walker MB, Kimmel CB and Postlethwait JH (2008) MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat. Genet.* **40**: 290-298.
 - 37) Swartz ME, Nguyen V, McCarthy NQ and Eberhart JK (2012) Hh signaling regulates patterning and morphogenesis of the pharyngeal arch-derived skeleton. *Dev. Biol.* **369**: 65-75.
 - 38) Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, and McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**: 1417-1430.
 - 39) Honig LS and Summerbell D (1985) Maps of strength of positional signaling activity in the developing chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**: 163-174.
 - 40) Endo T, Yokoyama H, Tamura K and Ide H (1997) Shh expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* **209**: 227-232.
 - 41) Casco-Robles MM, Yamada S, Miura T and Chiba C (2010) Simple and efficient transgenesis with I-SceI meganuclease in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev. Dyn.* **239**: 3275-3284.
 - 42) Hayashi T, Takeuchi T (2016) Mutagenesis in Newts: Protocol for Iberian Ribbed Newts. *Methods Mol. Biol.* **1338**: 119-126. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_10.
 - 43) Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei JF, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, Winkler S, Hastie AR, Young G, Roscito JG, Falcon F, Knapp D, Powell S, Cruz A, Cao H, Habermann B, Hiller M, Tanaka EM and Myers EW (2018) The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* **554**(7690): 50-55.
 - 44) Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR and Schlessinger J (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**: 955-960.
 - 45) Paterson JL, Li Z, Wen XY, Masih-Khan E, Chang

H, Pollett JB, Trudel S and Stewart AK (2004)
Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor

3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **124**: 595-603.