

ツメガエル神経胚の左側面にBMP-4を微量注射すると内臓左右軸が逆転する

茂木和枝・安積良隆・豊泉龍児・日野晶也・竹内重夫

(神奈川大学・理学部・応用生物科学科)

## 序論

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する成長因子が脊椎動物の左右軸形成に関与する、という報告が相次いでいる(Levin *et al.*, 1995; Meno *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1996; Levin, 1997)。Bone Morphogenetic Protein(BMP)はTGF- $\beta$ スーパーファミリーの一員であり、魚類のモデル動物であるゼブラフィッシュにおいては、BMP-4が左右軸形成に主導的に働くということが明らかになりつつある。

ゼブラフィッシュの正常胚では、BMP-4のmRNAは形態的には未だ対称な時期の心臓原基の左側に発現している。一方、心臓の左右性の崩壊した*floating head*や*iguana*等のゼブラフィッシュ変異体では、BMP-4のmRNAは心臓原基の両側で発現することが報告されている(Chen *et al.*, 1997)。正常な左右性を示すゼブラフィッシュ胚の右側にBMP-4遺伝子を異所的に発現させると心臓のみの逆位を生じる(Schilling *et al.*, 1999)。このことから、ゼブラフィッシュの胚発生において、BMP-4が左側に発現することが、右側に向かって心臓のloopingを起こさせるのではないかと考えられている。このように、BMP-4は魚類の原始心臓の左側に発現し、心臓の左右軸形成に関与していることが示唆されている。

ニワトリ胚では、BMP-2やBMP-4のmRNAは左右対称に発現する。これらのBMPは、胚の左側に発現する*nodal*のタンパク質に結合し、その発現を抑制する働きを持っている。しかし、*Caronte*タンパク質が胚の左側だけに局在することで左側のBMPタンパク質を特異的に吸収し、BMPが*nodal*に結合するのを妨害する。その結果、BMPタンパク質の存在量が左側で減少することになり、*nodal*は左側のみで左右非対称に発現し、このことが左右性の分化の鍵となることが報告されている(Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999; Yokouchi *et al.*, 1999)。このように、BMPが魚類や鳥類の左右軸形成においては重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし一方で、左右軸に関連した遺伝子カスケードは、脊椎動物間で大きな相違があることが知られている(Meyers & Martin,

1999; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999)。そこで筆者らは、両生類であるアフリカツメガエルの胚発生におけるBMPの左右軸への影響を調べる必要があると考えた。

ツメガエルの初期発生において、BMP-2やBMP-4は卵母細胞中で転写が開始され (Koster *et al.*, 1991; Plessow *et al.*, 1991; Clement *et al.*, 1995)、胞胚期における腹側中胚葉の誘導に関与していることが知られている (Hemmati-Brivanlou & Thomsen 1995; Schmidt *et al.*, 1995)。ツメガエル胚の背腹軸形成におけるBMPの役割については詳細に研究されているが (Dale *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1996)、BMPがツメガエルの左右軸形成に関与するのかどうかについては殆ど報告がない。卵割期のツメガエル胚にTGF- $\beta$ スーパーファミリーの一員である *Xenopus nodal-related 1* (*Xnr-1*)を発現するプラスミドを微量注射すると、50-60%の胚に内臓逆位を生じることが報告された (Sampath *et al.*, 1997)。BMPはTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する分子でありながらも、*nodal*とは異なるシグナル伝達系を有することから (Nomura & Li, 1998; Lagna & Hemmati-Brivanlou, 1999)、我々はBMPが *nodal*とは異なるメカニズムでツメガエルの左右軸形成に関与しているのではないかと考えた。16細胞期のツメガエル胚の左側の植物極側割球に、BMPsのmRNAを注射した場合に、50%の内臓逆位が生じることが最近報告された (Hyatt & Yost, 1998)。しかし、彼らはBMPのmRNAを卵割期に注射したので、何時、胚のどの部分で注射したmRNA由来のBMPタンパク質が合成され胚内での内臓の左右性に影響を与えたのかについては分からなかった。そこで我々は、BMP-4のタンパク分子を、形態的に左右対称なツメガエル神経胚の右側面や左側面に直接皮下注射することで、内臓逆位が誘起されるかどうかを調べ、BMP-4がツメガエル胚の左右軸形成機構に関与するの可否かを調べた。

## 材料と方法

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のメスに600-800U、オスに150-300Uの性腺刺激ホルモンを注射し、人工的に交配を誘起し得られた胚を材料にした。卵割期に脱ゼリーし、10%スタインバーグ氏液中で神経胚 (stage 12-18; Nieuwkoop & Faber, 1967) になるまで18-26°Cで飼育した。神経胚期のツメガエル胚の右側面あるいは左側面に、10 $\mu$ g/mlあるいは100 $\mu$ g/mlのBMP-4タンパク分子 (Recombinant Human Bone

Morphogenetic Protein-4, R & D 社)と、最終濃度1%のNile Blue 生体染料の混合溶液(混合比10:1)を5nl微量注射した。全ての実験において微量注射直前にコリオンを剥き、微量注射の技法は昨年度のMogiらの報告('98年度年報 参照)に準じた。対照実験として、神経胚の左右いずれか一側面に1% BSA(Bovine Serum Albumin)を1%のNile Blueと共に5nl微量注射した。微量注射後、24穴プレートの各孔に10%スタインバーグ氏液を2ml満たし、注射胚を1個体ずつ入れて、内臓の左右性の判定出来るst.41-43まで18-26℃で飼育した。4日胚に達した時に、主にst.41-43で、心臓と腸管の左右非対称性の正位/逆位を判定した。

## 結果と考察

ツメガエル神経胚の右側面皮下に50pgあるいは500pgのBMP-4を微量注射した場合には、内臓逆位はほとんど起こらなかった( $n=2/93$ )。一方、神経胚の左側面皮下に500pgのBMP-4を微量注射すると、22%の胚で内臓逆位が誘起された( $n=37/167$ )。内臓逆位を生じた37匹の胚の中で、心臓と腸の両方とも逆位を起こした胚は8匹(逆位胚のうちの22%)、心臓のみの逆位を起こした胚は28匹(逆位胚のうちの76%)、腸のみの逆位を起こした胚は1匹(逆位胚のうちの3%)であった(図1)。特に、初期神経胚(st.13-14)の左側に500pgのBMP-4を微量注射した場合には、内臓逆位が最高31%の注射胚で誘起された(表1参照)。

ゼブラフィッシュの変異体である*no tail*や*floating head*では、本来心臓原基の左側で発現するBMP-4が両側で発現している。これらの変異体は、BMP-4の発現変化の他に背側中軸を構成する脊索や体節の欠損があることも知られている(Chen *et al.*, 1997; Schilling *et al.*, 1999)。筆者らは、ツメガエル神経胚の背側中軸構造にBMP-4を作用させることで、内臓の左右軸形成が変化するのか否かについても調べてみた。神経胚の背側正中線上の皮下に50-500pgのBMP-4を微量注射したが、内臓逆位を誘起することはなかった( $n=0/46$ )。これらの結果から、BMP-4を神経胚の左側面に作用させた時にだけ、内臓逆位を誘起することができることが分かり、BMP-4がツメガエル胚の左右軸形成機構に関与することが示唆された。また、BMP-4は消化管よりも心臓の左右性に大きな影響を与えることも分かった。

ツメガエルのBMP-4のmRNAは尾芽胚の両方の眼や心臓原基に左右対称に発現することが知られている(Dale *et al.*, 1992; Nishimatsu *et al.*, 1992; Fainsod *et al.*, 1994; Hemmati-Brivanlou & Thomsen, 1995; Papalopulu & Kintner, 1996)。BMP-4のmRNAは初期神経胚期(st.14)には腹側後方や神経板の表皮に発現し、後期神経胚期(st.18)になると腹側前方に発現する(Nishimatsu *et al.*, 1992; Hemmati-Brivanlou & Thomsen, 1995)。神経胚の左側や右側に500pgのBMP-4を微量注射すると、高頻度で微量注射した側の眼に形成不全を生じることが分かった(表2参照)。背側正中にBMP-4を注射し、眼の形成不全を生じた胚の中には、両眼の存在が確認できないほどの重篤な色素性網膜の分化不良を起こす胚もあった(図2, n=3/9)。このように、BMP-4は中胚葉由来である心臓と外胚葉由来の眼の形成の両方に大きな影響を及ぼすことが分かった。

マウス、ニワトリ、ツメガエル、ゼブラフィッシュ胚において、*nodal*や*Pitx2*等の左右非対称に発現する遺伝子が左側の側板のみに発現することが知られており、これらの遺伝子は左右軸の形成に決定的な役割を果たすとされている(Levin, 1997; Lohr *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1998; St Amand *et al.*, 1998; Rebagliati *et al.*, 1998; Campione *et al.*, 1999)。一方、マウス胚で左右対称に発現する*Sonic hedgehog*や、ニワトリ胚で左右対称に発現するBMP-4が、自分自身は左右対称に発現するにも関わらず、左右非対称な遺伝子の発現調節を行うことが報告されている(Meyers & Martin, 1999; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999)。昨年我々は、*nodal*と同じTGF- $\beta$ スーパーファミリーに分類されるactivinタンパク分子を神経胚の右側面のみに作用させると、ほぼ100%の頻度で左右軸が逆転することを報告した(Mogiら, '98年度年報)。activinのmRNAは、ツメガエル神経胚期には背側前方に左右対称に発現する(Thomsen *et al.*, 1990; Dohrmann *et al.*, 1993)。我々は、ツメガエルの中期神経胚(95%以上の逆位が誘起可能な発生段階の胚)の右側面にactivinを微量注射して尾芽胚期に達した時に固定し、左右非対称に発現する*nodal*や*Pitx2*の発現パターンをwhole-mount *in situ* hybridization法を用いて調べた。その結果 *nodal*は43%、*Pitx2*は69%の注射胚において、左側での発現が右側にシフトした(第22回日本分子生物学会年会 講演要旨 p.464, 1999)。

今回我々は、BMP-4タンパク質を初期神経胚の左側面のみに作用させることで、内臓、特に心臓の左右軸を逆転させることが出来ることを発見した。activinとBMP-4の微量注射結果には、2つの顕著な違いがあった。一つは、activinの場合は、逆位を誘起するためには右側面に注射する必要があったのとは対照的に、BMP-4の場合は左側面に注射する必要があったことである。もう一つは、初期神経胚期において activinは10pgのタンパク質量を注射すれば95%以上の逆位を誘起したのに対し、BMP-4は500pgのタンパク質量を注射して、最高31%の逆位を誘起したという点である。このことから、形態的には全く左右対称な初期神経胚の左右の側板中胚葉の間で、早くもactivinやBMP-4に対する感受性が違っていることが分かった。感受性の違いの本質は、これらのリガンド分子を受け取る細胞膜上のリセプターの種類や左右でのリセプターの数の違いであると推測される。activinはActRIとActRIIの2つのリセプターを使うが、BMP-4はactivinリセプターとは異なるBMPRIとBMPRIIの2つのリセプターを主に使う(Graff *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1997; Frisch & Wright, 1998)。更に、activinやBMP-4のリガンドがリセプターに結合したという情報を核に伝えるための細胞内へのシグナル伝達系の違いも、左右の側板間で生じていると思われる。activinはSmadと呼ばれる細胞内シグナルタンパク質のグループの中でSmad2, Smad3を使い、BMP-4はSmad1, Smad5, Smad8を使っている(Zhu *et al.*, 1999; Christian & Nakayama, 1999)。ツメガエル神経胚の組織で駆動されるSmad分子群の、胚の左右でのリン酸化の程度の違いについては報告がないが、'98年度の筆者らの報告と本稿で紹介した結果を比較検討すると、Smad分子はツメガエル胚の左右で分布量もしくは利用度(例えばリン酸化されるSmadの比率やSmad分子の寿命等)が違っていると考えられる。

今後は、BMP-4を微量注射したツメガエル胚において、左右非対称に発現する*nodal*や*Pitx2*の発現や、細胞内シグナル伝達系であるSmadの発現がどのように変化するかを、whole-mount *in situ* hybridization法を用いて調べることで、ツメガエル胚における左右軸成立機構を解明したい。

#### 謝辞

本研究は1999年度総合理学研究所共同研究所助成の援助を得て行われました。

総合理学研究所所長並びに所員の先生方に感謝いたします。

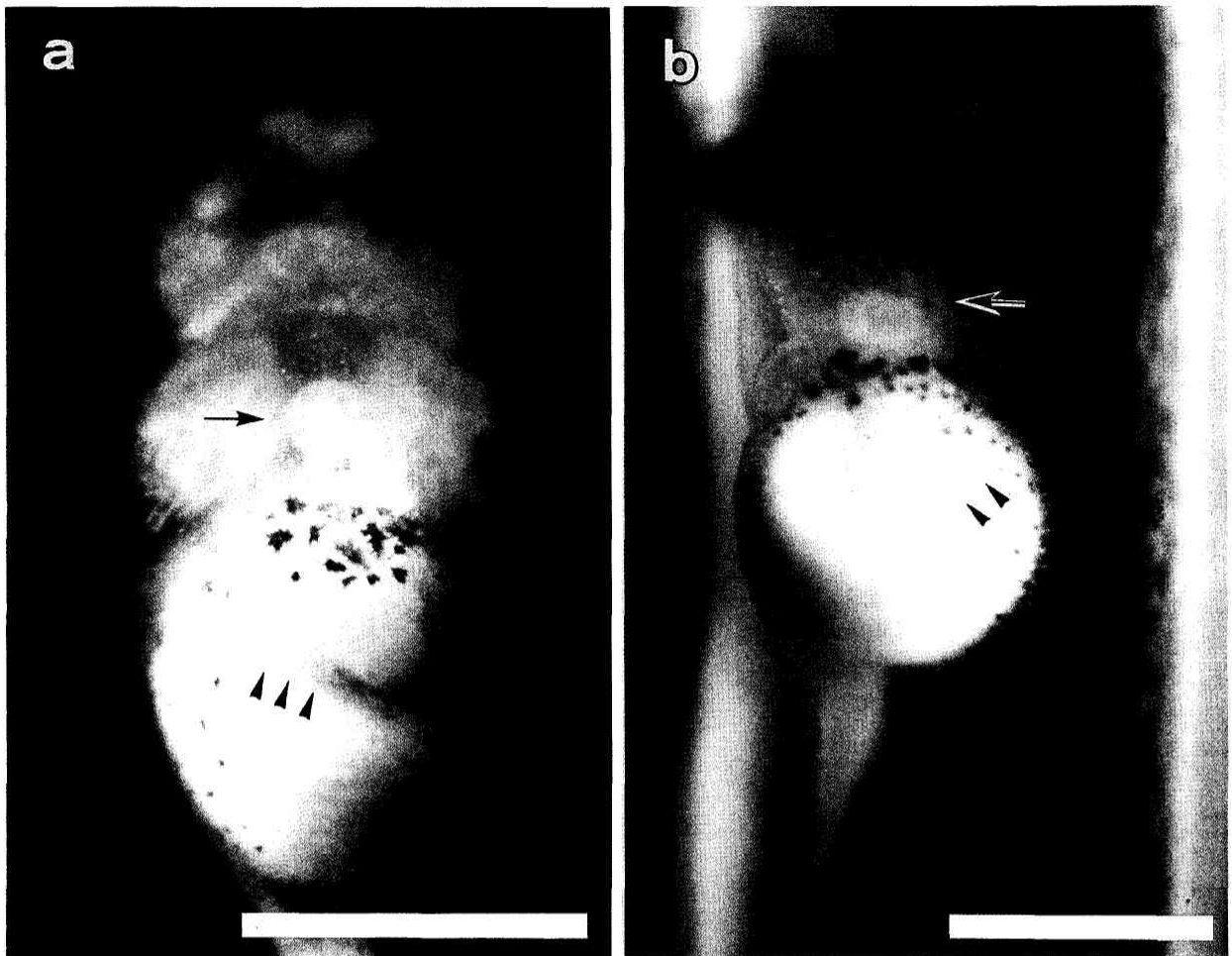


図1 BMP-4の微量注射による内臓逆位の誘起。

(a)st.43の正常胚の腹面からの写真。心室の 向かって左側から動脈球が出ている (矢印)。腸管は向かって左側に位置する腹側臍臓(矢尻)を取り囲むように巻き始め ている。

(b)初期神経胚(st.13-14)の左側面皮下に500pgのBMP-4タンパク質を微量注射し た結果、心臓と腸の両方に逆位を誘起した胚。心室の 向かって右側から動脈球が開 口している(矢印)。腸管は(a)と鏡像対称に形態形成を行っていることに注目。 写真は腹面から見ている。Scale barは1mm。

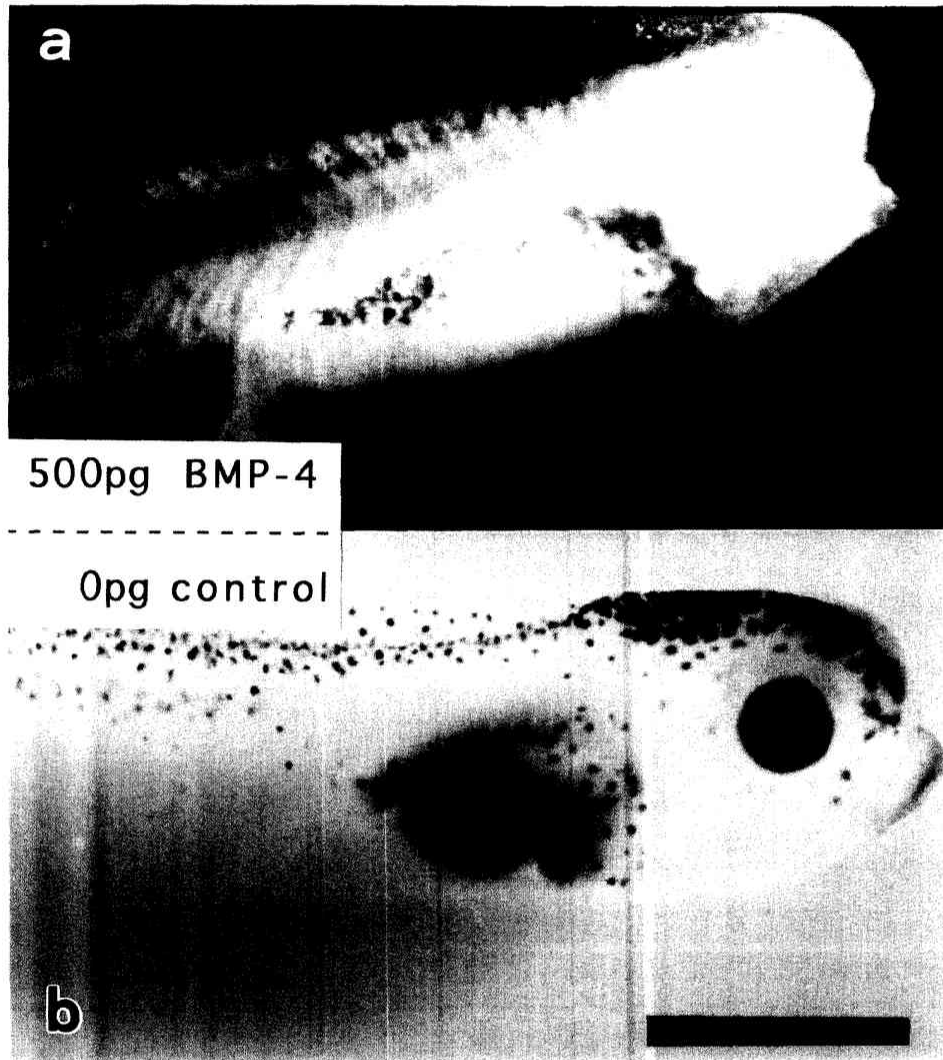


図2 BMP-4の微量注射によって、眼の形成不全を起こした胚の側面からの写真。  
(a)初期神経胚の背側に500pgのBMP-4タンパク質を微量注射し、眼の形成不全を  
起こした胚。両眼の形成が確認できないほどの重篤な色素性網膜の分化不良を起こ  
している。  
(b)st.43の正常胚。正常な眼形成が進行している。Scale barは1mm。

## Left

stage	gastrula	neurula stage		
	12-12.5	13-14	15-16	17-18
dose (pg)	Upper, %. Lower, inverted/survived.			
<b>500</b>	<b>18</b> 6/34	<b>31</b> 30/98	<b>3</b> 1/35	- -
<b>50</b>	- -	<b>0</b> 0/23	- -	<b>0</b> 0/22
<b>0</b>	- -	<b>2</b> 1/46		

## Right

stage	neurula stage		
	13-14	15-16	17-18
dose (pg)	Upper, %. Lower, inverted/survived.		
<b>500</b>	<b>2</b> 1/47	- -	- -
<b>50</b>	<b>0</b> 0/24	- -	<b>5</b> 1/22
<b>0</b>	<b>0</b> 0/23		

## Dorsal

stage	gastrula	neurula stage	
	12	13-14	17-18
dose (pg)	Upper, %. Lower, inverted/survived.		
<b>500</b>	<b>0</b> 0/18	<b>0</b> 0/26	- -
<b>50</b>	- -	- -	<b>0</b> 0/10

Upper, %.  
Lower, inverted/survived.

表1 BMP-4の微量注射による内臓逆位の出現率

500pgのBMP-4タンパク分子を初期神経胚の左側面に微量注射すると最高31%の胚に内臓逆位が誘起された。

stage	gastrula	neurula stage	
	12-12.5	13-14	15-16
500pg	Upper, %. Lower, inverted/survived.		
<b>Left</b>	<b>44</b> 15/34	<b>29</b> 28/98	<b>49</b> 17/35
<b>Right</b>	- -	<b>21</b> 10/47	- -
<b>Dorsal</b>	<b>50</b> 9/18	<b>0</b> 0/26	

表2 BMP-4の微量注射による眼の形成不全率

500pgのBMP-4タンパク分子を神経胚の左側や右側、あるいは背側に微量注射すると高頻度で眼の形成不全が生じた。



## 参考文献

- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M. R. and Blum, M. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-34.
- Chang, C., Wilson, P. A., Mathews, L. S. and Hemmati-Brivanlou, A. (1997). A *Xenopus* type I activin receptor mediates mesodermal but not neural specification during embryogenesis. *Development*. **124**, 827-837.
- Chen, J. N., Vaneeden, F. J. M., Warren, K. S., Chin, A., Nussleinvohard, C., Haffter, P. and Fishman, M. C. (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* **124**, 4373-4382.
- Christian, J. L. and Nakayama, T. (1999). Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF-beta family signals. *Bioessays* **21**, 382-390.
- Clement, J. H., Fettes, P., Knochel, S., Lef, J. and Knochel, W. (1995). Bone morphogenetic protein 2 in the early development of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **52**, 357-370.
- Dale, L., Howes, G., Price, B. M. and Smith, J. C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* **115**, 573-585.
- Dohrmann, C. E., Hemmati-Brivanlou, A., Thomsen, G. H., Fields, A., Woolf, T. M. and Melton, D. A. (1993). Expression of activin mRNA during early development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **157**, 474-483.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H. and Derobertis, E. M. (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *EMBO J.* **13**, 5015-5025.
- Frisch, A. and Wright, C. V. (1998). XBMPRII, a novel *Xenopus* type II receptor mediating BMP signaling in embryonic tissues. *Development* **125**, 431-442.
- Graff, J. M., Thies, R. S., Song, J. J., Celeste, A. J. and Melton, D. A. (1994). Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals *in vivo*. *Cell* **79**, 169-179.

- Hemmati-Brivanlou, A. and Thomsen, G. H. (1995).  
Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev. Genet.* **17**, 78-89.
- Hyatt, B. A. and Yost, H. J. (1998).  
The left-right coordinator: The role of Vgl in organizing left-right axis formation. *Cell* **93**, 37-46.
- Jones, C. M., Lyons, K. M., Lapan, P. M. and Wright, C. V. E. (1992).  
DVR-4 (Bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor *Xenopus* mesoderm induction. *Development* **115**, 639-647.
- Jones, C. M., Dale, L., Hogan, B. L. M., Wright, C. V. E. and Smith, J. C. (1996).  
Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* **122**, 1545-1554.
- Koster, M., Plessow, S., Clement, J. H., Lorenz, A., Tiedemann, H. and Knochel, W. (1991).  
Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech. Dev.* **33**, 191-199.
- Lagna, G. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999).  
A molecular basis for Smad specificity. *Dev. Dyn.* **214**, 269-277.
- Levin M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M. and Tabin, C. (1995).  
A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **8**, 803-814.
- Levin, M. (1997).  
Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays.* **19**, 287-296.
- Lohr, J. L., Danos, M. C. and Yost, H. J. (1997).  
Left-right asymmetry of a *nodal-related* gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development.* **124**, 1465-72.
- Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V. E., Potter, S. S., Overbeek, P. and Kuehn, M. R. (1996).  
Conserved left-right asymmetry of *nodal* expression and alterations in murine *situs inversus*. *Nature* **381**, 158-161.
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H. (1996).  
Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-155.

Meyers, E. N. and Martin, G. R. (1999).

Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* **285**, 403-406.

Mogi, K., Toyozumi, R. and Takeuchi, S. (1998).

Microinjection of activin into the right side of *Xenopus* neurula embryos induces complete inversion of the left-right axis of the heart and visceral organs.

神奈川大学総合理学研究所「年報'98」, 85-93.

Mogi, K., Toyozumi, R. and Takeuchi, S. (1999).

Activin and TGF- $\beta$ s cause 100% reversal of the visceral left-right axis and change of the expression pattern of left-right asymmetrically expressed genes by the microinjection into *Xenopus* neurula embryos.

第22回日本分子生物学会年会 講演要旨, p.464.

Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967).

External and internal stage criteria in the development of *Xenopus laevis*.

In *Normal table of Xenopus laevis*, pp. 162-188. Elsevier/North Holland Co. (Amsterdam).

Nishimatsu, S., Suzuki, A., Shoda, A., Murakami, K. and Ueno, N. (1992).

Genes for bone morphogenetic proteins are differentially transcribed in early amphibian embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **186**, 1487-1495.

Nomura, M. and Li, E. (1998).

Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**, 786-790.

Papalopulu, N. and Kintner, C. (1996).

A *Xenopus* gene, Xbr-1, defines a novel class of homeobox genes and is expressed in the dorsal ciliary margin of the eye. *Dev. Biol.* **174**, 104-114.

Plessow, S., Koster, M. and Knochel, W. (1991).

cDNA sequence of *Xenopus laevis* bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Biochim. Biophys. Acta.* **1089**, 280-282.

Rebagliati, M. R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P. and Dawid, I. B. (1998).

Zebrafish *nodal-related* genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **199**, 261-272.

Rodriguez-Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A. N., Pascual, J., Ortiz, A. and Izpisua Belmonte, J. C. (1999).

The novel *Cer*-like protein *Caronte* mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243-251.

- Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G. and Izpisua Belmonte, J. C. (1998). *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-551.
- Sampath, K., Cheng, A. M., Frisch, A. and Wright, C. V. E. (1997). Functional differences among *Xenopus nodal-related* genes in left-right axis determination. *Development* **124**, 3293-3302.
- Schilling, T. F., Concordet, J. P. and Ingham, P. W. (1999). Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev. Biol.* **210**, 277-287.
- Schmidt, J. E., Suzuki, A., Ueno, N. and Kimelman, D. (1995). Localized BMP-4 mediates dorsal/ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* **169**, 37-50.
- St Amand, T. R., Ra, J., Zhang, Y., Hu, Y., Baber, S. I., Qiu, M. and Chen, Y. (1998). Cloning and expression pattern of chicken *Pitx2*: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem Biophys Res Commun.* **247**, 100-105.
- Suzuki, A., Thies, R. S., Yamaji, N., Song, J. J., Wozney, J. M., Murakami, K. and Ueno, N. (1994). A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10255-10259.
- Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W. and Melton, D. A. (1990). Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* **63**, 485-493.
- Yokouchi, Y., Vogan, K. J., Pearse, R. V. and Tabin, C. J. (1999). Antagonistic signaling by *Caronte*, a novel *Cerberus-related* gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**, 573-583.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. and Thomsen, G. H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **12**, 687-693.