

TGF- β 分子の右側投与は両生類神経胚の内臓左右軸を完全に逆転する
—activin投与の内臓左右性への作用との共通点と相違点—

茂木和枝・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- β 分子は、細胞増殖の調節や細胞分化、癌細胞の形質転換等の様々な場面で生理活性を持つことが知られている(Todaro *et al.*, 1981; Todaro, 1982; Roberts *et al.*, 1990; Kingsley, 1994)。ニワトリ胚ではTGF- β 2とTGF- β 3のmRNAが予定心臓領域に発現することから、TGF- β 2とTGF- β 3は、ニワトリ初期胚の心臓形成に関与することが示唆されている(Potts *et al.*, 1992; Jakowlew *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1998; Boyer *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 1999)。ノックアウトマウスの表現型の解析から、TGF- β が初期の胚形成に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。TGF- β 2のノックアウトマウスでは、心臓、肺、感覚器、骨格、泌尿生殖器など多くの臓器に異常が見られた(Sanford *et al.*, 1997)。TGF- β type II receptorの変異は、消化器系などで発癌の原因となることが知られているが(Markowitz *et al.*, 1995)、このreceptorのノックアウトマウスでは、胎生10.5日で循環系の形成不全により致死性を示す(Oshima *et al.*, 1993)。このようにTGF- β シグナルは、哺乳類の胚形成に重要な働きをしている。両生類胚においては、そのモデル動物であるツメガエル胚を用いた解析から、TGF- β と類似の構造を持つ近縁分子であるactivinが中胚葉分化や神経分化等に重要な働きをしていることが明らかにされつつある。しかしながら、ツメガエル初期胚におけるTGF- β そのものの働きに関する研究は殆ど行われていなかった。近年、ツメガエル胚からactivinとは親和性のないTGF- β リガンド固有のreceptor(XT β R-I)がクローニングされた(Mahony and Gurdon, 1995)。XT β R-Iを過剰発現したツメガエル卵では、背側中胚葉の過形成が生じ、脊索が太くなる(Mahony and Gurdon, 1995)。このreceptorはactivin, BMP-4に対してはシグナル伝達を行わず(Mahony *et al.*, 1998)、dominant negative(機能欠損型)XT β R-IIは、二次軸誘導活性のある*siamois*や*Xwnt-8*のシグナル伝達を遮断するので、activinとは部分的には異なる経路で背側中胚葉の形成に関与していると考えられる。

筆者らは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーであるactivin分子をツメガエル神経胚の右側に注射すると、ほぼ100%の胚に内臓逆位が生じることを示した(総研年報'98)。一方、TGF- β スーパーファミリーに属さないNGF、HGF、midkineを注射した場合には、内臓左右軸を逆転することはなかった。従って、TGF- β スーパーファミリーに属する分子のみが、左右非対称性の成立に深く関与すると予想される。activinとTGF- β のシグナル伝達経路を比較すると、activin蛋白分子はactivin type I receptor (ActR-IAまたはActR-IB)とactivin type II receptor(ActR-IIAまたはActR-IIB)の双方と共に複合体を形成し、receptorの細胞内domainの働きにより、Smad2やSmad3をリン酸化する。Smad2やSmad3はいずれもSmad4と複合体を形成し、activinに特異的な転写因子Forkhead activin signal transducer (FAST)と共に、activinの標的遺伝子の

上流領域にあるFAST結合領域に結合し、標的遺伝子におけるmRNAの転写に必須の転写複合体を構成する(Chen *et al.*, 1997; Watanabe and Whitman, 1999; Yeo *et al.*, 1999)。一方、TGF- β は TGF- β type I receptor(T β R-I)とTGF- β type II receptor(T β R-II)の双方との親和性が強い(Heldin *et al.*, 1997)。その刺激により、細胞内シグナル伝達分子のSmad2またはSmad3がリン酸化され Smad4と複合体を形成するが、この点はactivinのシグナル伝達経路と共通している(Chen *et al.*, 1996; Nakao *et al.*, 1997)。TGF- β の刺激から生じたSmadの複合体は、TGF- β 特異的な転写因子と共に標的遺伝子の転写活性を調節すると考えられるが、初期胚発生の各局面で、この転写因子が何であるのかは不明である。以上のように、activinとTGF- β のシグナル伝達経路には、共通する部分と異なる部分がある。

TGF- β 5はツメガエルに特異的なTGF- β 分子であり、TGF- β 1と最も相同性が高い(Kondaiah *et al.*, 1990)。TGF- β 5のmRNAはツメガエル神経胚期(stage14)以降において初めて発現が開始し、尾芽胚期には沿軸中胚葉に左右対称に発現する(Kondaiah *et al.*, 2000)。しかし、ツメガエル初期胚の発生において、TGF- β 5がどのような役割を果たしているのかについては殆ど判っていない。筆者らは、ニワトリ胚の心臓形成にTGF- β が関与していることや、activinとTGF- β のシグナル伝達経路の共通性、TGF- β 5のツメガエル胚での発現開始時期(st.14)や発現場所(沿軸中胚葉；左右非対称に発現する遺伝子の発現領域である側板に広く隣接する領域)等の知見に注目し、activin同様、TGF- β 5もツメガエル神経胚の左右軸形成に大きな影響を及ぼすのではないかと考えた。筆者らが開発し、総理研年報'98で初めて報告した微量注射法で上記を検討し、同時に左右非対称な*Xnr-1*や*Pitx2*の遺伝子発現パターンに変化が生じているか否かについて検討した。その結果、TGF- β 5は activinとはやや異なるシグナル伝達経路で、ツメガエル神経胚・尾芽胚の内臓左右軸を強力に逆転させることが明らかとなった。

材料と方法

<ツメガエル卵と微量注射>

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のメスに500-600 units, オスに150-300 unitsの生殖腺刺激ホルモン(帝国臓器, ゴナドトロピン)を注射し、得られた胚を材料にした。卵割期に2.5%チオグリコール酸(pH8.6)を用いて脱ゼリーし、10%スタインバーグ氏液中に胚を移し、15-18°Cで神経胚-尾芽胚(st.13-34; Nieuwkoop and Faber, 1967)になるまで飼育し、実験に用いた。

マイクロピペット製作器(NARISHIGE社)で加工したガラス製の注射針(Drummond Co.)を、マイクロインジェクター(Drummond Co., 'Nanoject')にセットした。卵膜を除去した胚をテラサキプレート(Sumitomo Bakelite Co., Japan)に移し、神経胚や尾芽胚の右側あるいは左側の表皮直下に注射針を浅く差し、無菌的条件下で微量注射を行った。注射した成長因子は以下の通りである。2 μ g/mlまたは10 μ g/mlのTGF- β 5 (Recombinant Amphibian TGF- β 5; R & D systems Co., Lot. CJ058041)、10 μ g/mlのTGF- β 1 (Porcine TGF- β 1; R & D systems Co., Lot. B257091)、TGF-

β 2(Porcine TGF- β 2; R & D systems Co., Lot. C327061)、TGF- β 3(Recombinant Human TGF- β 3; R & D systems Co., Lot. FB098041)、2 μ g/mlのactivin A (recombinant bovine activin A; Innogenetics Co., Lot. R-8679)である。いずれも1%のBSA (Bovine Serum Albumin fraction V, Sigma Co.)溶液に溶かして、最終濃度が1%になるようにNile Blue色素マーカーを混入し(混合比10:1)、各5nl(nl=10⁻⁹ liter)を微量注射した。対照実験として、神経胚の左右いずれか一側面に、1% BSAを5nl微量注射した。0.1%BSAを含む10%スタインバーグ氏液を2ml満たした24穴プレートの各孔に、注射後の胚を1個体ずつ入れ、4日胚になるまで18-26℃で飼育した。心臓と腸管の左右の向きを、主にst.41-42で判定した。また、前後軸や背腹軸に沿った形態については、dorso-anterior index (DAI; Kao and Elinson, 1988)に従い判定し、写真撮影した。

<微量注射した胚における心臓と腸管の逆位の分類と逆位率>

st.41-42になった胚の内臓の配置を腹側から観察した。心臓と腸管の位置及び向きにより、実験群及び対照実験群の内臓の左右性を判定した。心臓と腸の両方とも逆位、心臓のみの逆位、腸のみの逆位の3種類を総称して内臓逆位と呼ぶことにした。本研究における内臓の逆位率の計算を下記のように定義した。逆位率は、心臓も腸も逆位の胚数と心臓のみまたは腸のみが逆位の胚数を足し、これを生存胚数で割り、その割合を百分率で示した。

逆位率(%)

$$= (\text{心臓も腸も逆位の胚数} + \text{心臓のみ逆位の胚数} + \text{腸のみ逆位の胚数}) \div (\text{生存胚数}) \times 100$$

<cDNAの形質転換と大量精製>

pBluescript SKのマルチクローニングサイト内に挿入された*Xenopus nodal related-1 (Xnr-1)*のcDNAは、濾紙に吸着された形でワシントン大学のRandall Moon教授から恵与された。*Xenopus Pitx2*のcDNAは、同じ形でソーク研究所のJuan Carlos Izpisua Belmonte博士から恵与された。濾紙に吸着したこれらのcDNAを、150mMのNaClを含むTE buffer(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0)に浸し、37℃で90分間プラスミドDNAを溶出した。Supercompetent cells HB101 (STRATAGENE社)にプラスミドDNA溶液を与え、この菌懸濁液20 μ lを50 μ g/mlのアンピシリン入り1.5%寒天LB培地に蒔いて、37℃で一晩培養して形質転換した。形質転換した単クローン性のコロニーを、アンピシリン入りのLB培地50mlに移植し、37℃で一晩振盪し大量培養した。塩化セシウム密度勾配遠心法を用いてプラスミドDNAを大量精製した。得られたプラスミドDNAは*in situ* hybridization用のDIG標識probe合成のための鋳型として用いた。

<whole-mount *in situ* hybridization>

whole-mount *in situ* hybridization用の胚は、固定液 MEMFA(0.1M MOPS, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄, 4% formalin)を用いて室温で固定した。固定後、固定液を TBST(140mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl pH7.6, 0.1% Tween20)、100%メタノールで順次に置換し、染色操作を行うまでは100%メタノール中で-20℃で保存した。実験群及び対照実験の胚における *Xnr-1* や *Pitx2* の mRNA の発現を、それぞれに対する DIG 標識の anti-sense probe を用いて、Harland の whole-mount *in situ* hybridization 法(1991)により調べた。染色後の胚は、0.1% Tween20 含有 PBS-(PTW) で洗浄し、*Xnr-1* や *Pitx2* の発現パターンを観察した。写真撮影後、50%グリセロール/PTW に胚を移し、4℃で保存した。

結果

<TGF-β5分子の右側注射胚における内臓逆位の誘起>

ツメガエルに特異的な TGF-β である TGF-β5 蛋白質を、ツメガエル神経胚の右側あるいは左側に 10-50pg 微量注射して内臓左右軸への影響を調べた。その結果、神経胚(st.13-18)の右側面に皮下注射した場合には、92%以上の胚に内臓逆位が誘起された(表1a)。神経管の閉じる神経管期(st.19-20)の胚に対しても、右側に TGF-β5 を注射すると 81%以上の胚に内臓逆位が生じた。一方、神経胚期から神経管期(st.13-20)の胚の左側に 10-50pg の TGF-β5 を注射した場合には、内臓逆位の出現率は 4%以下であった(表1b)。TGF-β を注射後の 4日胚や 7日胚を観察したところ、注射により内臓逆位が生じた以外には形態的な変化は観察されなかった(図1)。

TGF-β5 と構造の類似した TGF-β1、TGF-β2 または TGF-β3 を神経胚期-神経管期の胚の右側に 50pg 微量注射した場合には、TGF-β5 同様に高頻度で内臓逆位を誘起した(表1c)。しかしながら、神経胚の左側に TGF-β1、TGF-β2 を微量注射した場合には、殆ど内臓逆位は生じなかった(表1d)。

10-50pg の TGF-β5 を尾芽胚の右側に注射して、内臓逆位が誘起されるか否かを調べた。*Xnr-1* が左側に発現している時期の初期尾芽胚(st.21-24)の右側に TGF-β5 (50pg) を注射した場合には、45%-75% と高頻度で内臓左右軸の逆転を誘起した(表2)。一方、同量の activin を神経管期-初期尾芽胚(st.19-24)の右側に注射した場合には、37%(st.19-20)、25%(st.21-22)、3%(st.23-24) と発生の進行に伴って内臓逆位の出現率は減少した(表2)。両者の結果を比較すると、尾芽胚における TGF-β5 の逆位誘発活性は activin と比べて非常に強いことが判った。*Pitx2* が左側板に強く発現する時期の尾芽胚(st.27-34)では、右側に TGF-β5 (50pg) を注射しても、殆ど内臓の左右性への影響は無かった(n=4/186, 表2)。

<TGF-β5を神経胚や尾芽胚の右側に注射した場合の*Xnr-1*や*Pitx2*の発現変化>

50pg の TGF-β5 を初期-中期神経胚(st.13-16)の右側に注射した胚における *Xnr-1* と *Pitx2* の発現と、内臓逆位の出現率との関連を調べた。50pg の TGF-β5 を右側に注射

した場合の内臓逆位の出現率は95%であった($n=151/159$, 表1a)。注射胚の*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンを調べると、左側のみに発現、右側のみに発現、両側に発現するが左側が右側よりも広範囲に発現(左>右)、両側に発現し左側と右側が同程度に発現(左=右)、両側に発現するが右側が左側よりも広範囲に発現(左<右)、両側で発現が消失、の6種類の発現パターンが観察された(表3)。これらの発現パターンを、左側のみの発現、右側のみの発現、両側に発現(左>右, 左=右, 左<右の胚数を加算)、両側で発現無し、の4種類に分類した。TGF- β 5の右側注射によって本来左側のみに発現する*Xnr-1*については、左側のみに発現する胚が15%($n=4/26$)、右側のみに発現する胚が42%($n=11/26$)、両側に発現する胚が31%($n=8/26$)、両側で発現が見られない胚が12%($n=3/26$)であった(表3a中段)。*Pitx2*の場合、左側のみに発現する胚が4%($n=2/47$)、右側のみに発現する胚が70%($n=33/47$)、両側に発現する胚が17%($n=8/47$)、両側で発現が見られない胚が9%($n=4/47$)であった(表3a下段)。

一方、10pgのactivinを胚の右側面に注射した場合の内臓逆位の出現率は90%であった($n=149/166$, 表3b上段)。TGF- β 5を神経胚の右側に注射した時の*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンの変化は、activinを神経胚に注射した時の*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンの変化と非常に類似していた。*Xnr-1*は、TGF- β 5の注射胚では42%、activinの注射胚では43%の割合で、左側での発現が右側にシフトした。*Pitx2*は、TGF- β 5の注射胚では70%、activinの注射胚では69%の割合でその発現が左側から右側にシフトした(表3)。これらの結果から、TGF- β 5は、activin同様に*Xnr-1*と*Pitx2*の発現の側性を変更することで内臓逆位を誘起することが示唆された。

初期尾芽胚期(st.23-24)にTGF- β 5(50pg)を右側に微量注射した胚では、45%の胚に内臓逆位が生じた($n=88/195$, 表2)。この条件でTGF- β 5を注射した胚をst.30の尾芽胚に達した時点で固定して、*Pitx2*の発現変化を調べた。*Pitx2*の発現は、左側で発現した胚が26%($n=15/57$)、右側で発現した胚が7%($n=4/57$)、両側で発現した胚が67%($n=38/57$)であった(図2)。神経胚の右側にTGF- β 5を注射した場合には70%の胚で*Pitx2*が右側にシフトしたのと比較すると(表3a下段)、尾芽胚への注射における*Pitx2*の発現パターンは両側性の発現が大幅に増加していることが判った。

<TGF- β 5注射胚の*Pitx2*の発現パターンから期待される内臓逆位の発生率>

神経胚へTGF- β 5を注射した場合と尾芽胚へTGF- β 5を注射した場合の間で、*Pitx2*の発現パターンに大きな違いが観察された(図3b)。*Pitx2*の発現パターンを詳細に調べると、6種類の発現パターンが観察されたことや、TGF- β 5の注射時期によって*Pitx2*の発現パターンが異なることに注目し、TGF- β 5注射胚の内臓逆位の発生率を算出した。期待される内臓逆位の発生率は、(右側のみに発現)+(両側で発現したが左側より右側が広範囲に発現)+ $3/4 \times$ (両側で同程度に発現)+ $3/4 \times$ (両側での発現の消失)という計算式で計算した(図3a)。神経胚にTGF- β 5を注射した場合には期待される内臓逆位の発生率は91%であり、注射実験による実際の内臓逆位の出現率は95%であった(図3b, 表1a)。一方、尾芽胚にTGF- β 5を注射した場合、期待される内臓逆位の発生率は37%であり、実際の内臓逆位の出現率は45%であった(図3b, 表2)。神経胚の場合も尾芽胚の場合も、*Pitx2*の発現パターンから内臓逆位の出現率をよく説明できることが判った。これら

の結果から、*Pitx2*の発現の側性が将来の内臓の左右性に大きな影響を与えることが示唆された。

＜activinまたはTGF- β 5の注射によって誘導される*Xnr-1*と*Pitx2*の発現タイミングは両分子間で異なる＞

中期神経胚の右側にactivinを注射した場合、注射胚の多くは、尾芽胚期までには*Xnr-1*と*Pitx2*発現が右側にシフトし、*nodal*は43%、*Pitx2*は69%の胚で、左側での発現が完全に消失していた(表3b)。ここで筆者らは、注射したactivinは正常胚での発現時期よりも時間を繰り上げて早期に、*Xnr-1*と*Pitx2*を右側に誘導したのではないかと考えた。この仮説を検証するために、初期神経胚(st.13)の右側あるいは左側に10pgのactivinを注射した胚を、中期神経胚(st.15)で固定し、*Xnr-1*と*Pitx2*の発現が誘導されているか否かについて調べた。

*Xnr-1*については、初期神経胚期(st.13)にactivinを10pg注射した胚を、中期神経胚期(st.15)で固定した場合、左右どちらに注射した時にも、*Xnr-1*の発現が注射部位に認められた[右側注射の場合は63%(n=22/35), 図4a; 左側注射の場合は34%(n=13/38) 図4b]。*Pitx2*については、初期神経胚期(st.13)の右側にactivinを10-50pg注射した胚を、中期神経胚期(st.15)と後期神経胚期(st.18-20)の2つの発生段階で、固定して調べた。いずれの場合にも、注射部位に*Pitx2*の発現が認められた[st.15で固定した場合は41%(n=16/39), 図4c; st.18-20で固定した場合は32%(n=13/41)]。以上の結果から、神経胚の右側に注射されたactivinは注射部位に早期に*Xnr-1*と*Pitx2*の発現を誘導することにより、右組織を左構造へと分化誘導することが示唆された。

一方、TGF- β 5を神経胚の右側に注射した場合には、activin注射の場合と同様に*Xnr-1*と*Pitx2*の発現は強力に右側にスイッチした(表3)。それに加えて、activinは(*Xnr-1*と*Pitx2*の本来の発現時期よりも早い)中期神経胚期にこれらを発現誘導した(図5)。従って、TGF- β 5もactivin同様に*Xnr-1*と*Pitx2*をより若い発生段階で早期に発現誘導する可能性が期待された。ところが、初期神経胚(st.13)の右側あるいは左側にTGF- β 5(10pg)を注射し、中期神経胚期(st.15)で*Xnr-1*の発現を調べたところ、activinの場合とは異なり、*Xnr-1*が注射部位に早期に誘導されることはなかった(図4d, 図4e)。*Pitx2*の場合もTGF- β 5の右側注射により、中期神経胚(st.15)の右側に*Pitx2*が早期に発現することはなかった(図4f)。*Pitx2*は、中期神経胚のセメント腺や神経板前方に左右対称に発現するが(Campione et al., 1999)、TGF- β 5の注射によってこれらの発現が変化することはなかった。

考察

<TGF- β 5注射はツメガエル胚の内臓の左右性を強力に変更する>

ツメガエル神経胚(st.13-18)の右側面に50pgのTGF- β 5分子を微量注射したところ、94%以上の胚に内臓逆位を誘起した(表1a)。activin注射の場合も、神経胚への右側注射では90%以上の胚に内臓逆位を生じたので(表3b)、TGF- β 5とactivinは共にツメガエル神経胚の内臓の左右性を強力に変更することが判った。特に、初期-中期神経胚の右側にTGF- β 5を注射した場合の*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンは、activin注射で誘起されたこれらの遺伝子の発現パターンに著しく類似していた。以上の結果は、TGF- β 5はactivin同様に、*Xnr-1*と*Pitx2*の発現の側性を変更することで内臓の左右非対称性の成立に関与する可能性が高いことを示唆する。

神経管期の胚(st.19-20)や初期尾芽胚期の胚(st.21-24)に対しても、その右側にTGF- β 5分子(50pg)を微量注射すると、内臓逆位を誘起することが出来た(表2)。また、初期尾芽胚期(st.23-24)の胚の右側にTGF- β 5を注射した場合にも、45%の胚に内臓逆位の誘発活性があった(表2)。一方、activinの初期尾芽胚(st.21-24)への右側注射の場合では、最高でも25%の胚に内臓逆位を誘起したにすぎなかった。両実験の結果の相違は、TGF- β 5とactivinとの間で尾芽胚期の内臓の左右性決定機構への効果は異なることを示している。

<神経胚-尾芽胚へのTGF- β 5の注射による*Pitx2*の発現の側性の変化が将来の内臓の左右性に及ぼす影響>

神経胚(st.13-16)へのTGF- β 5の注射実験の結果と尾芽胚(st.23-24)へのそれとを比較すると、内臓逆位の出現率も*Pitx2*発現の右側への偏りの程度も異なっていた(表1a, 表2, 図3b)。神経胚と尾芽胚とではTGF- β 5注射による*Pitx2*発現パターンの違いがあるにも関わらず、どちらの場合も*Pitx2*の発現パターンから計算した内臓逆位の発生率の期待値は、実際の内臓逆位の出現率をよく説明していた(図3)。従って、*Pitx2*の側性は将来の内臓の左右性を決定する大きな要因の一つであると考えられる。

初期尾芽胚期(st.23-24)にTGF- β 5を右側に注射した胚は67%の頻度で、*Pitx2*が両側に発現した(図2, 図3b)。初期尾芽胚期(st.24)の胚では*Pitx2*が左側板に発現を開始するので、TGF- β 5の右側への注射により、左側での本来の*Pitx2*と右側に誘導された*Pitx2*の両方の*Pitx2*が発現したために、内臓の左右性がランダム化したと考えられる。ここで、*Pitx2*が両側に発現する条件で注射を行った胚でも、器官形成の両側化(isomerism)は生じていなかったことから、*Pitx2*は単に胚の左側のキャラクターを決定するのではないと思われる(もし左側のキャラクターを決定するだけならば、左相称化 left-isomerismが生じていた筈である)。尾芽胚への注射の場合、*Pitx2*が両側に発現した胚が大部分を占めたにも関わらず、心臓や腸管の器官形態は左右の向きを除いては正常であった。従って、*Pitx2*の機能は左右非対称な内臓器官の形(特に左側)を決めるのではなく、純粋に左右の極性のみに影響すると推察される。このように解釈すると、心臓や腸管の左右がランダム化したことと、器官の形態自体は正常であったことが共に説明できる。*Pitx2*のノックアウトマウスでは、内臓左右性が異常になることが報告されているこ

とと(Lu et al., 1999)、*Pitx2*は右側に発現可能であること(図3b, 図4c)を考え合わせると、左側では*Pitx2*を発現誘導し、右側では*Pitx2*の発現を抑制するメカニズムが機能することが、正常な左右性の成立に必要であると考えられる。

<胚の左右非対称性の成立において予想されるTGF- β 5の働き>

神経胚(st.13-16)の右側にTGF- β 5を注射し、尾芽胚期で*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンを調べてみたところ、これらはactivin注射の際の*Xnr-1*と*Pitx2*の発現パターンに非常に類似していた(表3)。しかしながら、TGF- β 5を初期神経胚期(st.13)に注射した場合には、*Xnr-1*と*Pitx2*の発現がactivin注射の時のように中期神経胚期(st.15)に繰り上がることはなかった(図4d-f)。このことから、activinとTGF- β 5とは完全に同じ経路を通して内臓逆位を誘起したわけではないことが示唆された。以下に、ツメガエルの左右軸形成におけるactivinとTGF- β 5のシグナル伝達経路に関して考察する。

activinはactivin receptorと複合体を形成し、細胞内にシグナルを伝える(Mathews and Vale, 1991; Mathews et al., 1992)。一方、TGF- β はTGF- β receptorと複合体を形成し、細胞内にシグナルを伝える(Lin et al., 1992, Franzen et al., 1993)。activinとTGF- β は結合するreceptorが異なっているにも関わらず、細胞内のシグナル伝達分子Smad2, -3, -4は共通している。Smadは更に転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の5'上流領域に結合し転写複合体を形成する(Massague, 1996, 1998)。activinの場合、activin特異的な転写因子FASTが同定されていて(Watanabe and Whitman, 1999)、*Xnr-1*遺伝子の5'上流にはFAST結合領域が存在する(Watanabe and Whitman, 1999; Osada et al., 2000)。以上の知見から、注射されたactivinにより、*Xnr-1*を含む応答遺伝子群がFASTを介して活性化されたと考えられる。しかしTGF- β 5を注射した場合、中期神経胚期に*Xnr-1*や*Pitx2*は発現誘導されなかったことから、TGF- β 5は後期神経胚期から発現するFASTとは異なる転写因子の存在下においてのみ、*Xnr-1*を誘導するのではないかと考えられる。つまり、TGF- β 5が注射されてもこの未知の転写因子が存在していない中期神経胚では、*Xnr-1*の発現は誘導されないと考えられる。更に、後期神経胚期に生じた転写因子は尾芽胚でも発現し続けているので、尾芽胚にTGF- β 5を注射しても逆位が生じたと推測される。一方、activinに関連する転写因子FASTのmRNAは神経胚期には発現が終息するという報告があるため(Watanabe and Whitman, 1999)、activinを神経管期(st.19-20)以降に注射しても、*Xnr-1*の5'上流に転写複合体は形成されず activinは尾芽胚の左右軸には影響を及ぼさなかったと考えられる。

<ツメガエル神経胚における左右非対称性の成立機構のモデル>

従来、胚の背側中央にある脊索や神経管等を含む中軸組織(神経管、脊索、脊索下索)は、胚の左側でのみ分泌される拡散性のシグナル分子が、胚の右側にまで拡散するのを防止する働きがあると考えられてきた(中軸バリア説; Danos and Yost, 1996; Lohr et al., 1997; Meno et al., 1998, 1999)。中軸組織が形成された後には、左側/右側組織の情報は共に反対側には伝わらないと考える研究者もいる(Hyatt and Yost, 1998)。左因子の拡散防止という役割を担う分子として、TGF- β スーパーファミリーに属する単量

体のLefty-1と呼ばれる分泌蛋白質が、マウス胚とニワトリ胚でその候補に挙げられている(Meno *et al.*, 1996; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999; Ishimaru *et al.*, 2000)。マウス胚やニワトリ胚では、*lefty-1*のmRNAは中軸組織の神経底板の左側部分にのみ発現するが、これが左側のNodal蛋白質が右側にまで拡散するのを防ぐ働きをすることでされている(Meno *et al.*, 1998; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999)。*lefty-1*のノックアウトマウスでは、肺等の内臓器官が左-左の左相称化を示す胚になるが(Meno *et al.*, 1998)、これは中軸組織の左側部分に*lefty-1*が無いためにNodal蛋白質が右側に拡散した結果として、右側も'左化'したため、左-左のisomerismになったと解釈されている。ツメガエル初期神経胚においても、中軸のバリア機能を低下させる目的で背側前方組織を取り除くと、*Xnr-1*が左右両側に発現し50%の胚に心臓逆位が生じることが報告された(Danos and Yost, 1996; Lohr *et al.*, 1997)。また、胴尾部の背側中軸組織を欠損した*no tail*や*floating head*等のゼブラフィッシュ変異体の胚では、50%の胚に内臓逆位が誘起されることも報告された(Chen *et al.*, 1997; Bisgrove *et al.*, 2000)。これらの例から、左右軸形成機構において中軸組織は側板から分泌されるシグナル分子の物理的なバリアとして重要な役割を果たしていると考えられている(図5)。

ツメガエルの神経胚には左右の組織間に既に中軸が存在している。しかしながら中軸のバリア機能だけからは筆者らの"100%逆位"を説明することが出来ないという事実は重要である。TGF- β あるいはactivinのいずれを注射しても、内臓器官が左右対称のisomerismを生じる胚は殆どなかった。activin、TGF- β の場合は90%以上の胚で内臓の左右性が逆転し、本来左側に発現するべき*Xnr-1*や*Pitx2*が左側では抑制されたことから、注射した右組織が左側へと分化し、同時に右組織で生じた'左への変更'という情報が何らかのシグナル伝達経路を通じて左側へ伝達され、その結果左組織は右側になったと考えられる。筆者らは、この現象を説明するためには、左右非対称性の成立過程において「中軸組織は、左右の情報を反対側に伝える」と考える必要があると考えている。これを「中軸のコミュニケーション説」と呼ぶことにし、activinやTGF- β 5の右側注射胚で、中軸組織における遺伝子発現の変化を調べることで自説の手がかりを得ようとしている。

ツメガエル正常胚において、分泌因子*Sonic hedgehog*(*Shh*)の発現を調べたところ、*Shh*は初期神経胚期(st.14)から尾芽胚期(st.36)まで、中軸組織での発現が持続していた(図6a)。これはEkkerら(1995)の報告を支持する。ツメガエル胚の*Shh*は、ニワトリ胚での左に偏った*Shh*の発現とは異なり、左右対称に発現していた。初期神経胚(st.13)の右側にactivinを注射し後期神経胚期(st.18-20)で固定し、中軸での*Shh*の発現を調べたところ、正常胚よりも強く発現していた(図6b)。初期神経胚(st.13)の右側にTGF- β 5を注射し中期神経胚期(st.15)で固定した場合にも、activin注射の場合と同様に、中軸の*Shh*はより強く発現していた(図6c)。これらの結果から、少なくとも1つの中軸発現遺伝子(即ち*Shh*)が、右側板注射により発現を増強されたと言える。これらの結果をもとに、ツメガエル正常胚と注射胚の左右非対称性成立機構について、下記のモデルを提案する(図7)。

TGF- β 5あるいはactivinを神経胚の右側に注射した場合には、右側に*Xnr-1*や*Pitx2*が誘導され、左側でのこれらの発現は抑制されることが示された(表3)。しかしながら、中軸にある中軸組織は物理的なバリア効果を持っているので、右に注射したTGF- β

分子は左側には拡散せず、直接 左側組織に影響を及ぼすことは出来ないはずである。TGF- β 5やactivinの注射では、中軸の*Shh*の発現が増強されたことから、TGF- β 5やactivinは、直接もしくは間接的に中軸因子を誘導すると予想される。ここでこの中軸因子が、左側での*Xnr-1*の発現を抑制すると考えてみる。すると、中軸因子が直接 左側で*Xnr-1*を抑制するならば、右側の*Xnr-1*も同じように抑制されることになり、42%の胚で右側のみに*Xnr-1*が発現する結果と矛盾する。そこで筆者らは、*Xnr-1*の上流にあって*Xnr-1*発現をトリガーする分泌因子*TF*の存在を仮定した。中軸因子はこの*TF*の発現を抑制することにより、下流の*Xnr-1*や*Pitx2*の発現は本来の左側で消失したと考えたと、実験結果を簡潔に説明することができる(図7左図)。一方、正常胚では、TGF- β 5やactivinの右側注射により生じた右側での一連の現象が、左側から生じていると考えられる(図7右図, 注: 注射分子は蛋白質なので「中軸因子による*TF*遺伝子発現の抑制」に影響しない)。

両生類胚では、卵割期胚の左側割球に 左右性決定にかかわる未知の分子が含まれていることが、卵の結紮実験の結果から予想されている(左半球の優位性; Spemann and Falkenberg, 1919)。ツメガエル神経胚では、この卵割期の左割球局在因子(LRC)の影響でTGF- β ・activinに似た未知の*Xnr-1*のトリガー因子(*TF*)が、中期神経胚期までに左側で発現すると考えた(図7右図)。TFは後期神経胚期に左側板中胚葉にのみ*Xnr-1*の発現をトリガーし、同時に中軸組織にある中軸因子の発現も誘導する。TFは中軸因子を誘導するが、中軸因子はネガティブフィードバックにより、左右両側で*TF*の発現を抑制する。左側で*TF*の発現が抑制されTF蛋白質が潤渇しても、既に*Xnr-1*が左側でオートクラインに発現しているため、*Xnr-1*は下流の*Pitx2*を誘導することができると考えられる。実際、*Xnr-1*の発現において、自己増幅的な正のフィードバック機構が働くことが知られている(Cheng et al., 2000; Osada et al., 2000)。一方、右側では*TF*の発現が完全に抑制されるので、右側に*Xnr-1*や*Pitx2*が発現することはない。中期尾芽胚期までに、左側組織のみで*Xnr-1*による*Pitx2*の誘導が生じ、正常な左右非対称性が成立すると考えた。

筆者らの実験結果、とくに100%近い内臓逆位の実験的な誘起を説明するためには、activin, TGF- β に似た生理作用をもつトリガー因子*TF*と、中軸から分泌され*TF*の発現を抑制する中軸因子の二つの存在を仮定するのがよく、また同じ仮定で正常発生における左右性成立機構も説明出来る。今後は、*Xnr-1*トリガー因子および中軸因子を同定し、これらによる*Xnr-1*や*Pitx2*に対する発現誘導/抑制の分子メカニズムを解明したい。

謝辞

本研究は2000年度総合理学研究所共同研究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。

a) Right

stage	neurula stage			neural tube st.
	13-14	15-16	17-18	19-20
dose (pg)	Upper, %; Lower, inverted/survived			
50	94 128/136	100 23/23	94 64/68	81 87/108
10	92 56/61	94 46/49	92 35/38	90 63/70
0	0 0/15	0 0/20		

b) Left

stage	neurula stage			neural tube st.
	13-14	15-16	17-18	19-20
dose (pg)	Upper, %; Lower, inverted/survived			
50	4 2/51	0 0/24	0 0/19	- -
10	0 0/28	0 0/18	0 0/21	0 0/16

c) Right

stage	neurula stage			neural tube st.
	13-14	15-16	17-18	19-20
growth factor	Upper, %; Lower, inverted/survived			
TGF-β 1	90 95/106	95 99/104	81 60/74	84 63/75
TGF-β 2	96 23/24	- -	88 15/17	80 18/20
TGF-β 3	87 13/15	83 10/12	100 14/14	73 19/26

d) Left

stage	neurula stage		
	13-14	15-16	17-18
growth factor	Upper, %; Lower, inverted/survived		
TGF-β 1	15 15/99	3 1/33	18 4/22
TGF-β 2	6 1/18	0 0/18	- -

表1 神経胚期-神経管期に、右側面あるいは左側面へTGF-β5, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3分子を微量注射した胚における、内臓逆位の出現率の発生段階依存性

表中の上段の数字は逆位の出現率(%)を、下段の分数の分母は生存胚数、分子は逆位を生じた胚数を示す。

- a) TGF-β5の右側への注射。10pg以上のTGF-β5を微量注射すると高頻度で内臓逆位を誘起した。
- b) TGF-β5の左側への注射。10-50pgのTGF-β5を微量注射したが、内臓逆位は殆ど生じなかった。
- c) 神経胚期-神経管期の胚の右側に50pgのTGF-β1, TGF-β2, TGF-β3を微量注射した。
- d) 神経胚の左側に50pgのTGF-β1, TGF-β2を微量注射した。内臓逆位は殆ど生じなかった。

Pitx2の発現stage

Xnr-1の発現stage

Right

stage	neural tube st.	early tail bud stage			tail bud stage			
	19-20	21-22	23-24	25-26	27-28	29-30	31-32	33-34
	Upper, %; Lower, inverted/survived							
TGF-β 5 50pg	81 87/108	75 124/166	45 88/195	34 57/168	0 0/49	0 0/45	4 3/68	0 0/24
TGF-β 5 10pg	90 63/70	58 50/86	23 30/129	1 1/93	0 0/49			
activin 50pg	37 17/46	25 5/20	3 1/32					

表2 神経管期-尾芽胚期の胚の右側面にTGF-β5あるいはactivinを微量注射した場合の内臓逆位の出現率の発生段階依存性

表中の上段の数字は逆位の出現率(%)を、下段の分数の分母は生存胚数、分子は逆位を生じた胚数を示す。st.19-26まではXnr-1が左側だけに発現する。Pitx2はst.26以降、実際に左右非対称な形態形成が始まるまで胚の左側に持続的に発現し続ける。st.19-24の胚の右側にTGF-β5を微量注射した場合には高頻度で内臓逆位が生じたが、activin注射では内臓逆位の出現率は非常に低かった。st.26以降の尾芽胚に対しては、TGF-β5を微量注射しても殆ど内臓逆位は生じなかった。

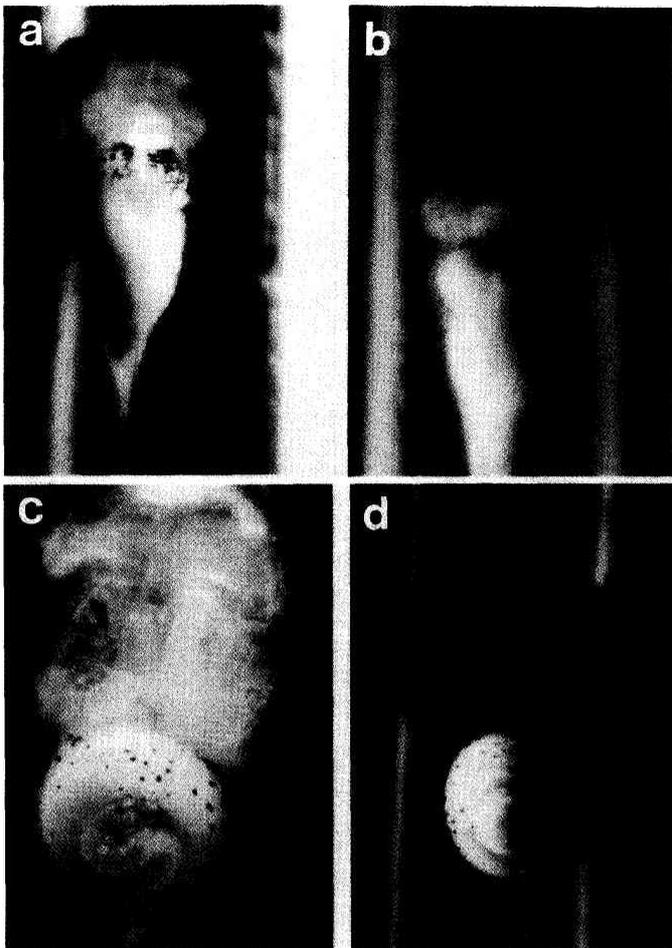


図1 ツメガエル神経胚の右側皮下に TGF- β を微量注射した4日胚と7日胚
 a) 無処理の4日胚(st.42)。心室の向かって左ななめ上に動脈球が位置し、腹側脾臓のくびれは向かって右側に見られ、腸管はC字形を描くようになる。
 b) 初期神経胚(st.14)の右側に、TGF- β 5(50pg)を注射して内臓逆位を生じた胚(4日胚)。動脈球は心室の向かって右ななめ上に位置し、腹側脾臓のくびれは向かって左側に見られ、腸管は逆C字形を描いている。
 c) 無処理の7日胚。心臓が体に対して右方向にloopingし、腸管は反時計回りに巻く。
 d) 中期神経胚(st.15-16)の右側に、TGF- β 3(10pg)を注射して、内臓逆位を生じた胚(7日胚)。cと比較して、心臓は体に対して左方向にloopingしていて、腸管は時計回りに巻いている。

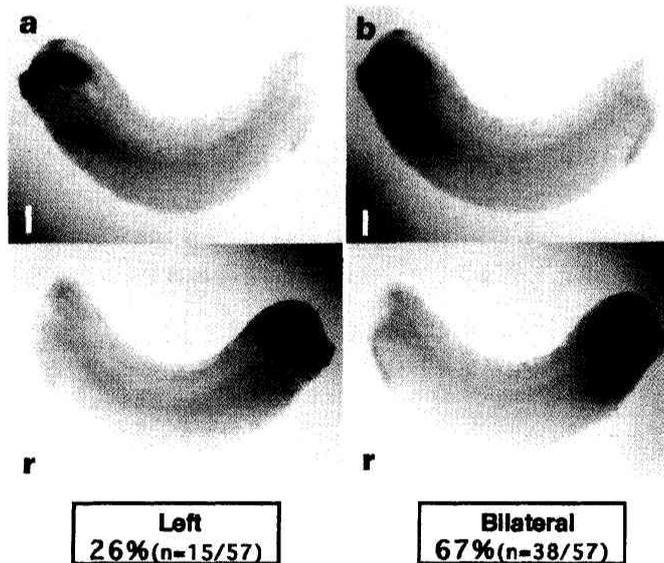


図2 初期尾芽胚(st.23-24)の右側面に、50pgのTGF- β 5を微量注射した胚における、*Pitx2*の左右非対称な発現パターンの変化
 a) TGF- β 5の右側への注射後に、*Pitx2*が左側のみに発現した胚(st.30)。
 b) TGF- β 5の右側への注射後に、*Pitx2*が両側に発現した胚(st.30)。両側に発現した胚の中では、*Pitx2*が右側よりも左側に広く発現するものがより多く観察された(図3b参照)。
 各組み写真は同じ胚を、上段は胚を左側から 下段は胚を右側から撮影したものである。

a) TGF-β5の神経胚(st.13-16)右側への注射

逆位率

正位	心臓逆位	腸逆位	全逆位
5% (n=8/159)	4% (n=7/159)	1% (n=2/159)	89% (n=142/159)

Xnr-1の発現

両側で発現					
左側のみ発現	左>右	左=右	左<右	右側のみ発現	両側発現なし
15% (n=4/26)	0% (n=0/26)	15% (n=4/26)	15% (n=4/26)	42% (n=11/26)	12% (n=3/26)
31% (n=8/26)					

Pitx2の発現

両側で発現					
左側のみ発現	左>右	左=右	左<右	右側のみ発現	両側発現なし
4% (n=2/47)	2% (n=1/47)	4% (n=2/47)	11% (n=5/47)	70% (n=33/47)	9% (n=4/47)
17% (n=8/47)					

b) activinの神経胚(st.15-16)右側への注射

逆位率

正位	心臓逆位	腸逆位	全逆位
9% (n=15/166)	20% (n=34/166)	2% (n=4/166)	67% (n=111/166)

Xnr-1の発現

両側で発現					
左側のみ発現	左>右	左=右	左<右	右側のみ発現	両側発現なし
16% (n=11/69)	4% (n=3/69)	12% (n=8/69)	19% (n=13/69)	43% (n=30/69)	6% (n=4/69)
35% (n=24/69)					

Pitx2の発現

両側で発現					
左側のみ発現	左>右	左=右	左<右	右側のみ発現	両側発現なし
12% (n=6/51)	2% (n=1/51)	8% (n=4/51)	8% (n=4/51)	69% (n=35/51)	2% (n=1/51)
18% (n=9/51)					

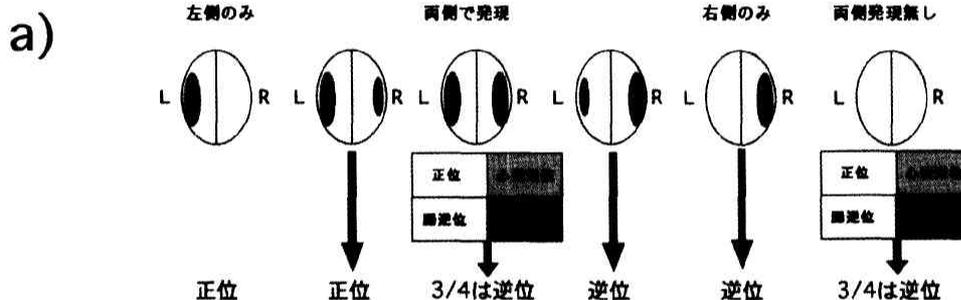
表3 TGF-β5またはactivinを神経胚の右側に注射した胚における内臓逆位の出現率と左右非対称な遺伝子の発現の変化
表中の上段の数字は逆位の出現率(%)を、下段の分数の分母は生存胚数、分子は逆位を生じた胚数を示す。

a) 50pgのTGF-β5を神経胚の右側に微量注射した胚。

(上段) TGF-β5注射による内臓逆位の出現率は95%(n=151/159)であった。(中段) TGF-β5の注射胚におけるXnr-1の発現パターン(図3参照)。(下段) TGF-β5の注射胚におけるPitx2の発現パターン。

b) 10pgのactivinを中期神経胚の右側に微量注射した胚。

(上段) activin注射による内臓逆位の出現率は90%(n=149/166)であった。(中段) activinの注射胚におけるXnr-1の発現パターン。(下段) activinの注射胚におけるPitx2の発現パターン。



期待される内臓逆位の発生率(%)

$$=(\text{右側のみ発現})+(\text{両側発現で左側より右側が広範囲に発現})+3/4 \times (\text{両側で同程度に発現})+3/4 \times (\text{両側での発現の消失})$$

Pitx2の発現	左側のみ発現	両側で発現			右側のみ発現	両側発現無し
		左>右	左=右	左<右		
神経胚	4% (n=2/47)	2% (n=1/47)	4% (n=2/47)	11% (n=5/47)	70% (n=33/47)	9% (n=4/47)
尾芽胚	26% (n=15/57)	32% (n=18/57)	25% (n=14/57)	11% (n=6/57)	7% (n=4/57)	0% (n=0/57)

期待される内臓逆位の発生率(%)を以下に示す。

神経胚への注射の場合.....(70)+(11)+(4×3/4)+(9×3/4)=91(%)

尾芽胚への注射の場合.....(7)+(11)+(25×3/4)+(0×3/4)=37(%)

図3 TGF-β5の右側注射により生じたXnr-1とPitx2の発現パターンの分類と、その発現パターンから期待される内臓逆位の発生率の計算(a)と中期神経胚(st.15-16)または初期尾芽胚(st.23-24)の右側に、TGF-β5を注射した胚におけるPitx2の発現パターン(b)

Pitx2の発現パターンから推定した期待される内臓逆位の発生率を算出したところ、神経胚では91%、尾芽胚では37%であった。

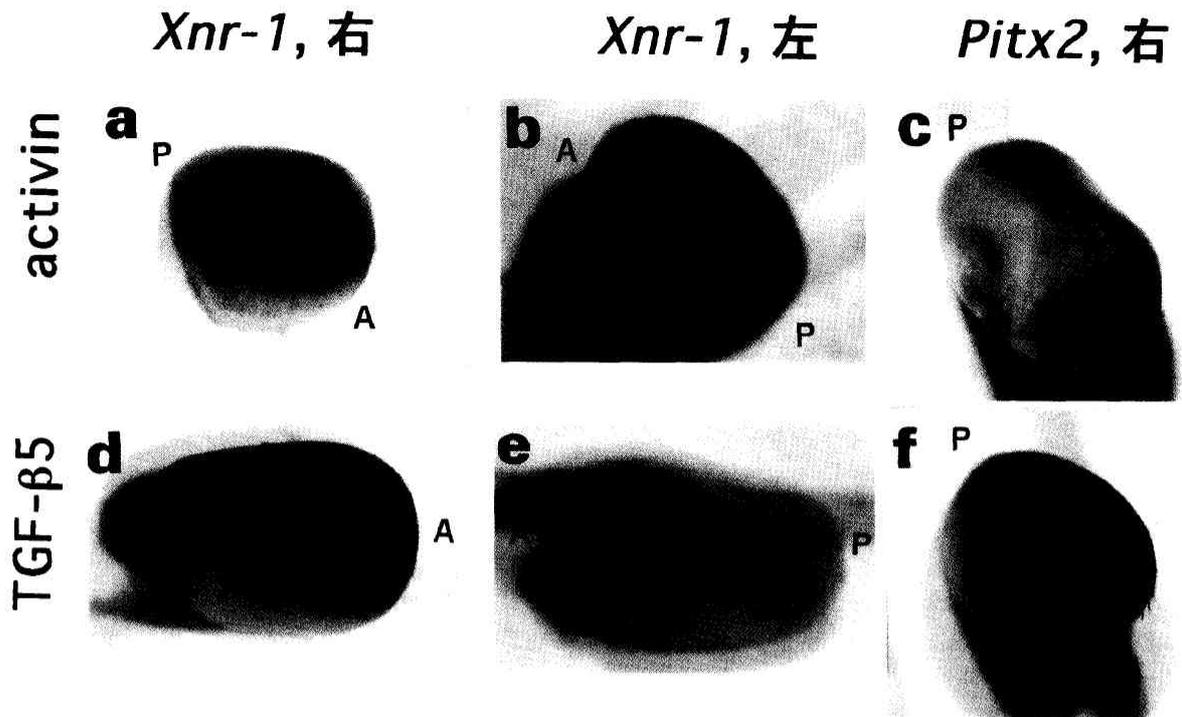


図4 初期神経胚(st.13)の右側あるいは左側に、10pgのactivinあるいはTGF- β 5を微量注射し、中期神経胚(st.15)に固定した胚における*Xnr-1*と*Pitx2*の発現
a, b, cはactivinの注射胚。d, e, fはTGF- β 5の注射胚。

- a) 右側の注射部位に*Xnr-1*を発現した胚(63%, n=22/35)。
 - b) 左側の注射部位に*Xnr-1*を発現した胚(34%, n=13/38)。
 - c) 右側の注射部位に*Pitx2*を発現した胚(41%, n=16/39)。
 - d) 右側の注射部位に*Xnr-1*の発現は見られない(n=0/41)。
 - e) 左側の注射部位に*Xnr-1*の発現は見られない(n=0/18)。
 - f) 右側の注射部位に*Pitx2*の発現は*Xnr-1*同様に認められない(n=0/18)。
- A, 前方; P, 後方。

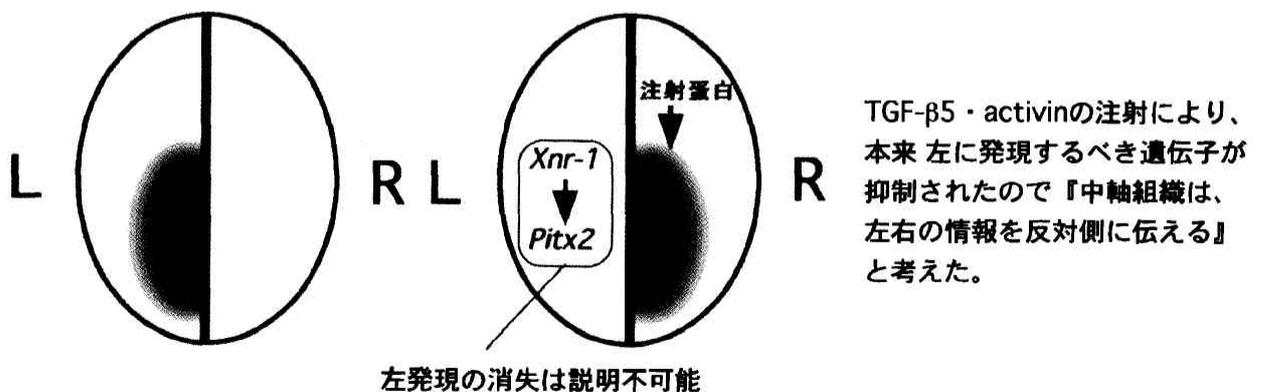


図5 中軸による左因子の拡散防止(midline barrier theory)

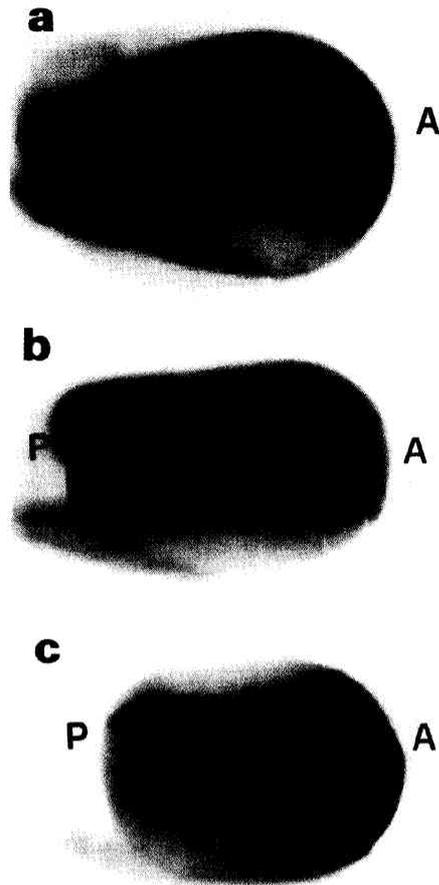


図6 ツメガエル神経胚の中軸組織でのSonic hedgehog(*Shh*)の発現

a) 無処理胚(st.14)の*Shh*発現。
 b) 初期神経胚期(st.13)の右側にactivin(10pg)を注射し、神経胚期(st.18-20)で固定した胚。正常胚と比較して、*Shh*は中軸でより強く発現している。
 c) 初期神経胚期(st.13)の右側にTGF- β 5(10pg)を注射し、中期神経胚(st.15)で固定した胚。activin注射の場合と同様に*Shh*は中軸でより強く発現している。
 A, 前方; P, 後方。

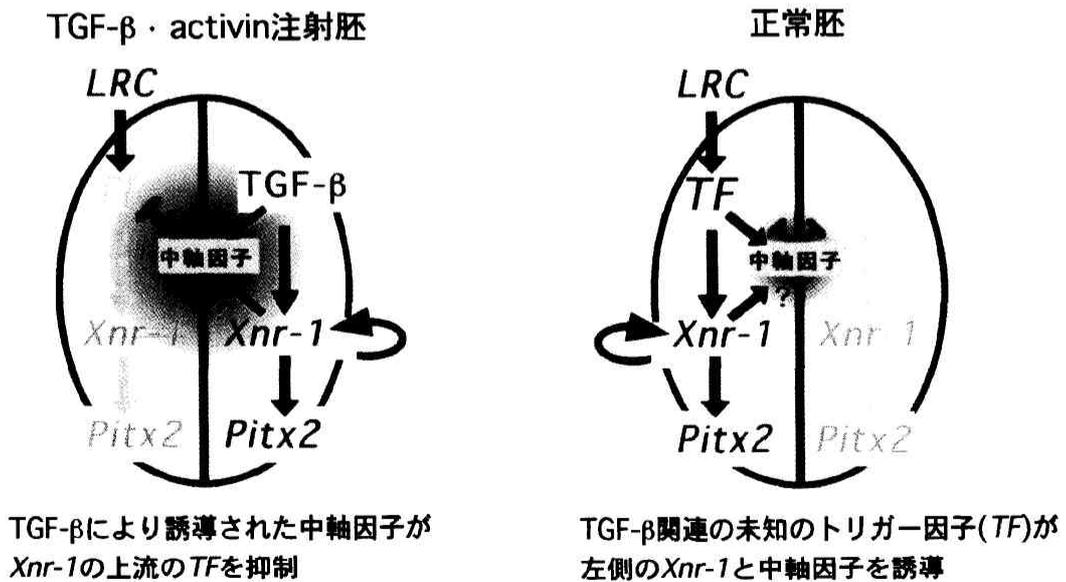


図7 正常胚と注射胚の左右非対称性の成立のメカニズム

参考文献

- Bisgrove, B. W., Essner, J. J., and Yost, H. J. (2000). Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development* **127**, 3567-3579.
- Boyer, A. S., Ayerinkas, I. I., Vincent, E. B., McKinney, L. A., Weeks, D. L., and Runyan, R. B. (1999). TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev. Biol.* **208**, 530-545.
- 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.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G., and Whitman, M. (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* **389**, 85-89.
- Chen, Y., Lebrun, J. J., and Vale, W. (1996). Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 12992-12997.
- Cheng, A. M., Thisse, B., Thisse, C., and Wright, C. V. (2000). The lefty-related factor *Xatv* acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in *Xenopus*. *Development* **127**, 1049-1061.
- Danos, M. C., and Yost, H. J. (1996). Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 96-103.
- Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, C. J., Lee, J. J., von Kessler, D. P., Moon, R. T., and Beachy, P. A. (1995). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* **121**, 2337-2347.
- Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C. H., and Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* **75**, 681-692.
- Harland, R. M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* **36**, 685-95.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471.
- 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.
- Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Tao, H., Thisse, B., Thisse, C., V. E. Wright, C., Hamada, H., Ohuchi, H., and Noji, S. (2000). Asymmetric expression of *antivin/lefty1* in the early chick embryo. *Mech. Dev.* **90**, 115-118.
- Jakowlew, S. B., Ciment, G., Tuan, R. S., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1994). Expression of transforming growth factor-b2 and b3 mRNAs and proteins in the developing chicken embryo. *Differentiation* **55**, 105-118.
- Kao, K. R., and Elinson, R. P. (1988). The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* **127**, 64-77.
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* **8**, 133-146.
- Kondaiah, P., Sands, M. J., Smith, J. M., Fields, A., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Melton, D. A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1089-1093.
- Kondaiah, P., Taira, M., Vempati, U. D., and Dawid, I. B. (2000). Transforming growth factor-beta5 expression during early development of *xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **95**, 207-209.
- Lin, H. Y., Wang, X. F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A., and Lodish, H. F. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775-785.
- 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.
- Lu, M. F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L., and Martin, J. F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401**, 276-278.
- Mahony, D., and Gurdon, J. B. (1995). A type I serine/threonine kinase receptor that can dorsalize mesoderm in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 6474-6478.
- Mahony, D., Weis, F. M. B., Massague, J., and Gurdon, J. B. (1998). XTrR-I is a TGFbeta receptor and overexpression of truncated form of the receptor inhibits axis formation and dorsalising activity. *Mech. Dev.* **75**, 95-105.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W.,

- Vogelstein, B., and et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability [see comments]. *Science* **268**, 1336-1338.
- Massague, J. (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* **85**, 947-950.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753-791.
- Mathews, L. S., and Vale, W. W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**, 973-982.
- Mathews, L. S., Vale, W. W., and Kintner, C. R. (1992). Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. *Science* **255**, 1702-1705.
- Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W. S., Robertson, E. J., Schier, A. F., and Hamada, H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol. Cell* **4**, 287-298.
- 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.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., and Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* **94**, 287-297.
- Mogi, K., Toyozumi, R., and Takeuchi, S (1999). 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」原報 pp. 85-93.
- Nakajima, Y., Yamagishi, T., Nakamura, H., Markwald, R. R., and Krug, E. L. (1998). An autocrine function for transforming growth factor beta 3 in the atrioventricular endocardial cushion tissue formation during chick heart development. *Ann. N Y Acad. Sci.* **857**, 272-275.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* **16**, 5353-5362.
- 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).
- Osada, S. I., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C. Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., and Wright, C. V. (2000). Activin/nodal responsiveness and asymmetric expression of a *Xenopus* nodal-related gene converge on a FAST-regulated module in intron 1. *Development* **127**, 2503-2514.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M. M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* **179**, 297-302.
- Potts, J. D., Vincent, E. B., Runyan, R. B., and Weeks, D. L. (1992). Sense and antisense TGF beta 3 mRNA levels correlate with cardiac valve induction. *Dev. Dyn.* **193**, 340-345.
- Roberts, A. B., Flanders, K. C., Heine, U. I., Jakowlew, S., Kondaiah, P., Kim, S. J., and Sporn, M. B. (1990). Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **327**, 145-154.
- 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.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659-2670.
- Spemann, H., und H. Falkenberg. (1919). Ueber asymmetrische Entwicklung und Situs inversus viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen. *Arch. Entwmech. Org.* **45**, 371-422.
- Todaro, G. J., De Larco, J. E., Fryling, C., Johnson, P. A., and Sporn, M. B. (1981). Transforming growth factors (TGFs): properties and possible mechanisms of action. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* **15**, 287-301.
- Todaro, G. J. (1982). Autocrine secretion of peptide growth factors by tumor cells. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **60**, 139-147.
- Watanabe, M., and Whitman, M. (1999). FAST-1 is a key maternal effector of mesoderm inducers in the early *Xenopus* embryo. *Development* **126**, 5621-5634.
- Yamagishi, T., Nakajima, Y., and Nakamura, H. (1999). Expression of TGFbeta3 RNA during chick embryogenesis: a possible important role in cardiovascular development. *Cell Tissue Res.* **298**, 85-93.
- Yeo, C. Y., Chen, X., and Whitman, M. (1999). The role of FAST-1 and Smads in transcriptional regulation by activin during early *Xenopus* embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 26584-26590.