

Title	ホヤ胚における表皮細胞特異的遺伝子群の構造と発現(Dissertation_全文)
Author(s)	植木, 龍也
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1995-03-23
URL	http://dx.doi.org/10.11501/3099615
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

学位論文

ホヤ胚における表皮細胞特異的 遺伝子群の構造と発現

京都大学理学部動物学教室

植木龍也

目次

I. 序文	1
II. 材料と方法	5
A. ホヤ成体および胚の採集	
B. 部分胚および卵割阻害胚の作製	
C. mRNA の抽出	
D. In vitro トランスレーションと二次元電気泳動	
E. 卵割阻害1細胞胚に特異的な cDNA の単離	
F. 表皮細胞特異的遺伝子の cDNA の正常胚からの再単離	
G. In situ ハイブリダイゼーション	
H. ノーザンブロット解析	

- I. サザンブロット解析
- J. シーケンシング
- K. 表皮細胞特異的遺伝子の単離
- L. 転写開始点の決定
- M. フュージョンコンストラクトの作成
- N. 顕微注入法
- O. ウェスタンブロットティング
- P. 間接蛍光抗体法

III. [結果](#)..... 14

- A. 卵割阻害1細胞胚における特異的 mRNA の存在
- B. 表皮細胞特異的遺伝子の cDNA の単離
- C. 表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現様式の解析
- D. 表皮細胞特異的遺伝子の cDNA クローンの再単離と塩基配列の解析
 - 1. 囊胚からの cDNA クローンの再単離
 - 2. HrEpiB 遺伝子の cDNA の解析
 - 3. HrEpiD 遺伝子の cDNA の解析
- E. HrEpiD/HRSEC61 遺伝子の発現様式
 - 1. mRNA の発現様式
 - 2. 蛋白質の発現様式
- F. 特異的遺伝子レベルでの表皮細胞分化の自律性の証明
 - 1. 部分胚における HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の自律的発現

2. 卵割阻害胚における HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の自律的発現

G. 遺伝子の単離と構造解析

H. HrEpiB 遺伝子のプロモーター領域の機能解析

I. HrEpiD 遺伝子のプロモーター領域の機能解析

J. 2 つの表皮細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の塩基配列の比較

IV. [考察](#)..... 28

A. マボヤ卵割阻害1細胞胚における表皮細胞の分化形質の特異的発現

B. 胚および幼若個体における表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現様式

C. マボヤ胚における SEC61 遺伝子ホモログの発現様式

D. 表皮細胞特異的遺伝子の自律的発現

E. 表皮細胞特異的遺伝子の発現調節機構

V. [謝辞](#)..... 35

VI. [引用文献](#)..... 36

VII. [図表](#)..... 45

主論文要旨

ホヤ胚の表皮細胞は自律的に分化する。この自律的分化をもたらす分子機構を解明する目的で、表皮細胞の分化形質のみを発現することが知られていたマボヤ卵割阻害1細胞胚を利用して、表皮細胞で特異的に発現する8種類の異なる遺伝子のcDNAを単離した。ノーザンブロット解析の結果、これらの遺伝子の時間的発現様式は、(a)母性転写産物の有無、(b)変態開始後の転写産物の有無という2点を基準にして、4タイプに分類された。そこで、それぞれを代表する遺伝子を選び、HrEpiA, B, C および D と名付けた。そして、ザイゴティックに発現する HrEpiA と B の 2 つの遺伝子をプローブとして、単離割球から発生した部分胚および卵割阻害胚を用いて、表皮細胞分化の自律性を遺伝子レベルで証明した。

次に、HrEpiBとDについて、正常胚から再単離した全長に近いcDNAの塩基配列を決定した。HrEpiB遺伝子産物は、ある種のイソメラーゼと類似性があった。HrEpiD遺伝子産物は、ER膜の構成成分で分泌蛋白質のER内腔への輸送に必須な因子であるSec61蛋白質のホモログであった。さらに、HrEpiBとDの2つの遺伝子を単離し、その構造を解析した。そして、転写開始点を+1として、HrEpiB遺伝子では上流-345塩基対までの領域を、HrEpiD遺伝子では-166塩基対までの領域をレポーター遺伝子に結合してマボヤ受精卵に導入したところ、レポーター遺伝子はどちらも囊胚後期頃から表皮細胞で特異的に発現した。これらの領域の塩基配列を決定して比較したところ、2つの遺伝子の間に共通の塩基配列が多く見いだされた。これらの配列が表皮細胞特異的発現に関わっている可能性が高い。

序文

動物の初期発生における細胞の発生運命は、自律的あるいは調節的に決定される。動物の種によって、大部分の組織における細胞分化が自律的に決定されるもの（モザイク的発生様式）から、多くの組織において調節的な分化決定が重要な役割を持つもの（調節的発生様式）まで様々である（例えば Davidson, 1986; Davidson, 1990; Melton, 1991; Gurdon, 1992 の総説を参照）。各々の動物は、その発生過程において、これら2種類の細胞運命決定方式を巧みに組み合わせている。最近の分子遺伝学や分子生物学の進歩によって、細胞運命の決定と特異的遺伝子発現が密接に関わっていることが明らかになっているが、私自身は、自律的な細胞分化過程における組織特異的遺伝子の発現制御の解析を行ないたいと考えた。調節的な発生運命の決定は、細胞間の相互作用によって行われる誘導現象である。それに対して、自律的な発生運命の決定においては、細胞の内在性の因子によって発生運命が決定される。その過程では、まず卵細胞質中の特定の領域に局在している母性因子が、一定の卵割によって特定の細胞系譜に受け継がれていく。この母性因子は、細胞の運命決定に必要な転写制御因子を、直接あるいは間接的に制御する（Wilson, 1925; Davidson, 1986; Davidson, 1994; Satoh, 1994 の総説を参照）。自律的な細胞運命の決定の例としては、ホヤ胚の尾部の筋肉細胞（例えば Whittaker et al., 1977; Whittaker, 1980; Venuti and Jeffery, 1989; Satoh et al., 1990; Satoh, 1994）、ウニ胚の骨片形成間充織細胞（Davidson, 1989; Cameron and Davidson, 1991）、両生類胚の表皮細胞（Sargent, 1989）、巻貝の1種 *Ilyanassa* の中胚葉帯の端細胞（Clement, 1952; Davidson, 1986）、線虫の下皮細胞（Cowan and McIntosh, 1985）などの研究が挙げられる。

現代分子発生生物学の進歩により、自律的あるいは調節的な細胞分化における個々の遺伝子の転写調節機構に関して次第に明らかになるとともに、各組織において多数の遺伝子がどのようにして時間的・空間的に調和をとって発現するかに関する

知見も次第に蓄積しつつある (J 劃 kle, 1992; Davidson, 1994; Edgar, 1994; Lawrence, 1994 の総説を参照)。しかし一つの生物の全ての組織の細胞分化を遺伝子の転写調節のレベルで統合的に理解するにはまだ多くの研究を必要とする。本研究では、モザイク的な発生様式における卵内の母性因子から胚の最終分化に至る全分化過程を理解することを最終目標として、胚の組織の種類および各組織の細胞数が少ないという利点を持つホヤ類を研究対象に選んだ。

脊索動物尾索類のホヤは最も高度にモザイク的な胚発生をする動物として前世紀の終わり頃から注目されてきた (Chabry, 1887; Conklin, 1905a, b)。ホヤ胚においては、B4.1 系統の筋肉細胞、表皮細胞、内胚葉細胞、間充織細胞がそれぞれ自律的に分化し (Satoh, 1994 の総説を参照)、A4.1 と b4.2 由来の筋肉細胞、神経細胞、色素細胞は誘導によって分化することが知られている (例えば、Rose, 1939; Reverberi and Minganti, 1946; Whittaker et al., 1977; Nishida, 1991)。これらの組織の中で、歴史的に特に多くの研究者の興味の対象になってきたのは、自律的に分化する B4.1 系統の筋肉細胞である。受精後に卵細胞質再配置によって受精卵の植物極後方に局在するマイオプラズムと呼ばれる細胞質領域は、ある種のホヤでは色素の違いで識別でき、正確でかつ一定の卵割によって B4.1 系統の筋肉系統の細胞に受け継がれる。このマイオプラズム中の何らかの細胞質因子が、筋肉細胞の分化の決定に重要な役割を担う (例えば、Nishida, 1992b; Marikawa et al., 1994a, b)。おそらくこの因子が筋肉細胞に特異的な転写因子を活性化することによって、筋肉細胞特異的な構造遺伝子の転写を引き起こすと考えられている。ホヤ胚の筋肉組織における遺伝子の発現制御機構に関しては、日本では、食用に養殖されていて比較的大量の卵や胚を得られるマボヤ *Halocynthia roretzi* と、世界中に広く分布していて古くから実験発生学に用いられているカタユレイボヤ *Ciona intestinalis* およびユレイボヤ *Ciona savignyi* を用いて研究が行われている。既にマボヤ胚から、最終的な筋肉分化マーカーである筋肉アクチンの cDNA (Kusakabe et al., 1991) とミオシン重鎖の cDNA (Makabe and Satoh, 1989; Makabe et al., 1990; Makabe et al., 1992)、またそれらの前段階で働いていると期待されている MyoD 関連遺伝子の cDNA (Araki et al., 1994) の単離と発現様式の解析が報告されている。またカリフォルニア大学デービス校の Jeffery らは、*Styela plicata* の筋肉アクチンの発現の解析を報告している (Tomlinson et al., 1987b; Jeffery, 1989; Beach and Jeffery, 1992)。しかし、ひるがえって、ホヤ胚における筋肉細胞以外の細胞型を考えた場合、自律的発生の機構を研究するのにより有利な系として表皮細胞が浮かび上がってくる。マボヤのオタマジャクシ幼生の発生にともなって、正確に 800 個の表皮細胞が分化する。その細胞系譜は完全に解明されており、表皮細胞は 8 細胞期の動物半球の 4 つの割球にのみ由来する (Conklin, 1905b; Nishida and Satoh, 1983, 1985; Nishida, 1987)。そして 16 細胞期という早い時期にす

でに2個の細胞で、また32細胞期には10個の細胞で予定表皮細胞の発生運命の限定が起こる(Nishida and Satoh, 1985)。そのような早期の発生運命の限定を反映して、卵割期の胚から単離された予定表皮細胞は顕著な分化の自律性を示す(Reverberi and Minganti, 1946; Nishikata et al., 1987)。この高い自律分化能を担う卵細胞質因子の存在が示されており、その因子は、卵核胞に由来する透明な細胞質に含まれていると考えられている(Conklin, 1905b; Jeffery, 1983)。最近になって、卵片あるいは割球断片の細胞質融合実験から、表皮細胞分化を担う卵細胞質因子が受精後の再配置によって受精卵の動物極付近に局在することが示唆されている(Nishida, 1994)。また、予定表皮細胞の分裂は同調的に起こるので、分化過程におけるDNAの複製回数の意義といった問題についての解析の糸口になる可能性がある(Satoh, 1982, 1984, 1994の総説を参照)。以上のような知見から、マボヤの表皮細胞は自律的な細胞分化機構を研究する上で非常に適した系であるといえる。

これまで、ホヤ胚の表皮細胞の分化マーカーとして、形態学的な幼生型被囊の形成(Mancuso, 1973)、特徴的な電気的性質(Hirano et al., 1984)、2種類の表皮細胞特異的モノクローナル抗体(Nishikata et al., 1987)が用いられてきた。しかしながら、遺伝子レベルでの表皮細胞分化のマーカーは得られていなかった。本研究においては、まず表皮細胞の分化形質のみを発現することが知られていたマボヤの卵割阻害1細胞胚を利用して、表皮細胞で特異的に発現する8種類の異なる遺伝子のcDNAを単離した(Ueki et al., 1991)。ノーザンブロット解析の結果、これらの遺伝子の時間的発現様式は、母性転写産物の有無および変態開始後の転写産物の有無という2点を基準にして、(1)未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に初めて現れて変態開始後消える、(2)未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に現れ変態開始後も存在する、(3)未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後に消える、(4)未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後も存在し続ける、という4タイプに分類された。そこで、それぞれを代表する遺伝子を選び、HrEpiA, B, C および D と名付けた。

HrEpiBとDについて、正常胚から全長に近いcDNAを再単離し、塩基配列を決定した。HrEpiB遺伝子産物はイソメラーゼと類似性があり、またHrEpiD遺伝子産物は、ER膜の構成成分で分泌蛋白質のER内腔への輸送に必須な因子であるSec61蛋白質と高い相同性を示した(Ueki and Satoh, 1994)。また、サイゴティックに発現するHrEpiAとBの2つの遺伝子を分子マーカーとして、卵割阻害胚および単離割球から発生した部分胚を用いて、表皮細胞分化の自律性を遺伝子レベルで証明した(Ueki et al., 1994)。

HrEpiBとDの2つの遺伝子を単離し、その構造を解析した。そして、HrEpiB遺伝子では転写開始点を+1として上流-345塩基対の領域を、HrEpiD遺伝子では-166塩基

対の領域をレポーター遺伝子に結合してマボヤ受精卵に導入したところ、レポーター遺伝子はどちらも囊胚後期頃から表皮細胞で特異的に発現した。そこでこれらの領域の塩基配列を決定して比較したところ、2つの遺伝子の間に共通の塩基配列が多く見いだされた。これらの研究によって、ホヤ胚の表皮細胞分化の分子メカニズムの解析が可能になったと思われる。

材料と方法

一般的な分子生物学的実験における反応条件等は、プロトコール集 (Sambrook et al., 1989) に従ったので詳しい記述を省略する。

A. ホヤ成体および胚の採集

マボヤ *Halocynthia roretzi* の成体は、産卵期に東北大学理学部附属浅虫臨海実験所 (青森市) および東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター (岩手県大槌町) の近辺で購入した。自然に放卵させた未受精卵に他個体の精子懸濁液を加えて媒精した。受精した卵は濾過海水中で 11~13°C で発生させた。ほぼ全てのバッチの胚において、胚発生は同調的に進行する。受精後約 12 時間で囊胚になり、約 24 時間で尾芽胚に達し、約 40 時間で孵化して遊泳幼生となった。遊泳幼生はさらに 12 時間以上後に変態可能になる。最終濃度 0.1 オ g/ml のナイルブルーを海水中に加えることによって人為的に変態開始を誘導した。変態を完了した幼若個体はプラスチック皿に接着させ、自然海水を循環させた水槽中に入れて飼育した。卵、各発生段階の胚、遊泳幼生、幼若個体は、低速遠心で回収して、mRNA 抽出用あるいは *in situ* ハイブリダイゼーション用に保存した。

B. 部分胚および卵割阻害胚の作製

部分胚

媒精の約 30 分後の受精卵を、0.1% (w/v) チオグリコール酸ナトリウム (和光純薬工業、大阪)、0.05% アクチナーゼ E (科研化学、東京) を含む海水で 5 分程度処理してコリオンを除去した。コリオンを除去された卵は、1% アガロースをコートしたペトリ皿上で培養した。2 細胞胚、4 細胞胚、8 細胞胚の割球あるいは割球対 (図 17) を、それぞれの細胞周期の前半に、実体顕微鏡下でガラス針を用いて分離した。分離された割球は、それぞれ部分胚として発生させた。すべての部分胚は、50 オ g/ml のストレプトマイシン硫酸塩を含むミリポア濾過海水中で、対照胚が孵化する頃 (受精後約 40 時間) まで培養した後、*in situ* ハイブリダイゼーション用に固定した。

卵割阻害胚

媒精の約1時間後の受精卵、あるいは、2細胞胚、4細胞胚、8細胞胚から単離した割球あるいは割球対（図17）を、2オg/mlのサイトカラシンB（Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA）を含む海水中に移し、卵割を継続的に阻害したまま発生させた。この状態の受精卵は、卵割を停止するが核分裂は進行し、卵割阻害胚として発生する（Whittaker, 1973a）。対照胚が孵化する頃まで発生させた後、mRNA抽出用には凍結保存し、in situ ハイブリダイゼーション用には固定した。

C. mRNAの抽出

mRNA抽出用のサンプルはまず低速遠心で回収し、部分胚の作製に用いたのと同様の方法で、コリオンを除去した。濾過海水で洗浄した後、再び低速遠心を行なって海水を完全に除去した。その後液体窒素で急速に凍結し、 -80°C で保存した。トータルRNAは、AGPC法を若干改良した方法によって抽出した（Chomczynski and Sacchi, 1987）。凍結サンプルを細かく砕いた後、6~8倍量の変性バッファー（組成は、5.5M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH7.0, 0.5% N-laurylsarcosyl, 0.2M 2-mercaptoethanolである）に懸濁し、氷上でガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズした。それ以後の処理はAGPC法に従った。最終的に得られたRNA溶液に対して、等量の8M LiClを加えてRNAを沈殿・精製した。poly(A)+RNAはOligotex-dt30（日本ロッシュ、東京）を用いて、標準的プロトコールに従って抽出した。

D. In vitro トランスレーションと二次元電気泳動

1オg/オIのPoly(A)+RNAを3オIに対して、40オIのウサギ網状赤血球ライセート（N90Y; Amersham）および7オIの $[35\text{S}]$ -メチオニン（2.1mCi/ml; Amersham）を混合し、 37°C で60分間インキュベートした。等量の2×リシスバッファー（1×リシスバッファーの組成は、9.5M Urea, 2% NP-40, 5% mercaptoethanol, 1.6% Ampholine pH3.5-10, 0.4% Ampholine pH5.0-7.0である）を加えて混合したものを、翻訳産物とした。約1/5量の翻訳産物を用いて、基本的にO'Farrell et al. (1977)に従って非平衡二次元電気泳動を行なった。簡単に述べると、まず第一次元は2% Ampholine, pH3.5-10を含むpHグラジエント・ウレア変性4%ポリアクリルアミド・キャピラリーゲル（直径2mm）で翻訳産物を分離した。電圧は400Vで、4時間泳動した。第二次元はSDS変性10%ポリアクリルアミドゲルで泳動を行なった。泳動後のゲルを乾燥して、X線フィルム（RX; 富士写真フィルム、神奈川）に2~3日露光した。

E. 卵割阻害1細胞胚に特異的なcDNAの単離

卵割阻害1細胞胚のcDNAライブラリーの作製 マボヤ卵割阻害1細胞胚から抽出した3オグの Poly(A)+RNA を鋳型にして、Oligo-dT12-18 (Pharmacia, Milwaukee, WI, USA) をプライマーに用いて RAV-2 逆転写酵素 (宝酒造、京都) で逆転写した。合成された cDNA を2本鎖にした後、12 mer EcoRI リンカー (Pharmacia) を連結して lgt10 ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の EcoRI 部位に挿入した。独立の280万クローンからなるファージライブラリーの内、90万を増幅して以下のスクリーニングに用いた。ディファレンシャルスクリーニング 受精卵および卵割阻害1細胞胚から抽出した poly(A)+RNA 各 4.5オグを、M-MLV 逆転写酵素 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) で逆転写して直接^[32P]-dCTP を取り込ませて、各々約 5000 万 cpm のトータル cDNA プローブを得た。卵割阻害1細胞胚の cDNA ライブラリーをプレーティングし、同一のプレートから転写された2枚のニトロセルロース膜に対して、各々のプローブを約 500 万 cpm/ml の濃度で加えてハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、50% formamide, 6 × SSC, 0.5% SDS, 0.5% skim milk, 100mg/ml denatured salmon sperm DNA 水溶液中で、42°Cで16時間以上行なった。それぞれオートラジオグラフを行なった後、受精卵のプローブに対してはネガティブで、卵割阻害1細胞自身のプローブに対してポジティブなファージのみをクローニングした。クローニングされたファージのインサートを挟んで向かい合う2種類のプライマーを用いた PCR 法によってインサートを増幅し、EcoRI で切断してから pBluescript II SK (+) ベクターの EcoRI 部位にサブクローニングした。c3 クローンについては内部に EcoRI 部位があったので、以後の実験の各種プローブの鋳型には EcoRI 部位よりも3'側の約 800 塩基対の断片のみを用いた。

F. 表皮細胞特異的遺伝子のcDNAの正常胚からの再単離

正常囊胚のcDNAライブラリーの作製 マボヤ正常囊胚から抽出した3オグの Poly(A)+RNA を鋳型にして、Oligo-dT12-18 (Pharmacia) をプライマーに用いて M-MLV 逆転写酵素 (Gibco BRL) によって cDNA を合成した。得られた cDNA を2本鎖にした後、12 mer EcoRI リンカー (Pharmacia) を連結して lZapII ベクター (Stratagene) の EcoRI 部位に挿入した。スクリーニング HrEpiA、B、C、D (後述) のそれぞれの遺伝子に対応する卵割阻害1細胞胚由来の cDNA である c5、c1、c2、c3 をプローブの鋳型として用いた。それぞれの cDNA インサートの全長を2本鎖の状態に LMP 精製し、ランダムプライム DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用いて、^[32P]-dCTP でラベルした DNA プローブを合成した。正常囊胚 cDNA ライブラリーに対して、それぞれのプローブを用いて標準的な条件でスクリーニングを行い、各遺伝子について複数のポジティブクローンを得た。各々について最長のものを選び、Stratagene 社のプロトコールに従って in vivo excision 法によってインサートのサブク

ローニングを行なった。その結果それぞれのサブクローンは、pBluescript SK (-) プラスミドベクターの EcoRI 部位に挿入された。

G. In situ ハイブリダイゼーション

切片

切片に対する in situ ハイブリダイゼーションは、基本的には Tomlinson et al. (1987b)に従って行なった。簡単に記述すると、胚は氷冷したエタノールおよび酢酸 (3:1 混合溶液) で固定し、パラプラスト (Monoject, St. Louis, MO, USA) に包埋し、8 オ m の厚さの切片にした。1 オ g/ml の プロテナーズK (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) で 37°C で 30 分間処理した後、4%パラフォルムアルデヒド中で室温で 30 分間、後固定した。[35S]-ATP でラベルした RNA プローブ (約 1×10^7 cpm) を含む 60 オ l のハイブリダイゼーション液 ($2 \times$ SSC, 50% formaldehyde, $1 \times$ Denhardt's solution, 10% dextran sulfate) を試料に加えた。ハイブリダイゼーションは、45°C で約 16 時間行なった。ハイブリダイゼーション後の試料は、20 オ g/ml の膵臓由来 RNaseA (Sigma) で 37°C で 30 分間処理した後、ハイストリンジェンシーで洗い、オートラジオグラフィを行なった。

ホールマウント

ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションは、ディゴキシジェニンでラベルした DNA および RNA の両プローブを用いて行なった。RNA プローブについては基本的には Yasuo and Satoh (1994) および Miya et al. (1994) に従って行なった。手短に述べると、試料は 4%パラフォルムアルデヒド液 (4% paraformaldehyde, 0.1M MOPS, pH7.8, 0.2M NaCl, 0.4M MgCl₂) 中で固定した。DNA プローブは DIG DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用い、RNA プローブは DIG RNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用いて、それぞれ付属のプロトコルに従って合成した。固定した試料を PBT で十分に洗った後、2 オ g/ml のプロテナーズ K-PBT 溶液で、37°C で 30 分間処理した。続いて 4%パラフォルムアルデヒド-PBT 溶液で室温で 60 分間固定した。42°C で 1 時間プレハイブリダイゼーション処理した後、最終濃度 0.1mg/ml のディゴキシジェニンラベルしたプローブを加えて 15 時間以上ハイブリダイゼーションを行なった。その後、1:2000 希釈のアルカリフォスファターゼ標識-抗ディゴキシジェニン抗体複合体 (Boehringer Mannheim) PBT 溶液中で 1 時間インキュベートし、Boehringer Mannheim 社のプロトコルに従って発色反応を行なった。

H. ノーザンブロット解析

卵、各発生時期の胚、遊泳幼生、幼若個体から抽出した Poly(A)+RNA を、6%ホルムアルデヒドを含む 1%アガロースゲルで分離した後、0.05M 水酸化ナトリウム水溶液によって 2~3 時間でナイロンフィルター (HyBond-N+; Amersham) にブロットした。ブロットされたフィルターを、5 × SSPE, 0.5% SDS, 5 × Denhardt's solution, 50% formamide, 100 才 g/ml denatured salmon sperm DNA 水溶液中で 42°C で 2 時間前処理した後、ランダムプライム法を用いて [32P]-dCTP でラベルした DNA プローブを 2 × 10⁵cpm/ml の濃度で加えて、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。その後、2 × SSC, 0.1% SDS 中で 65°C で 15 分を 3 回、さらに 0.1 × SSC, 0.1% SDS 中で 65°C で 10 分を 1 回洗った後、X 線フィルム (RX; 富士写真フィルム) に露光した。露光は半日から 3 日程度行なった。

I. サザンブロット解析

Sambrook et al. (1989) に従って抽出されたマボヤの高分子量ゲノム DNA (日下部岳広博士の提供) を 3 種類の制限酵素 (BamHI, EcoRI, HindIII) で十分に消化し、0.4% アガロースゲルで分離した後、0.4M 水酸化ナトリウム水溶液によって 2~3 時間でナイロンフィルター (HyBond-N+; Amersham) にブロットした。ブロットされたフィルターを、6 × SSC, 0.5% SDS, 0.5% skim milk, 50% formamide, 100 才 g/ml denatured salmon sperm DNA 水溶液中で 42°C で 2 時間前処理した後、ランダムプライム法を用いて [32P]-dCTP でラベルした DNA プローブを 2 × 10⁵cpm/ml の濃度で加えて、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。その後、2 × SSC, 0.1% SDS 中で 65°C で 15 分を 3 回、さらに 0.1 × SSC, 0.1% SDS 中で 65°C で 10 分を 1 回洗った後、X 線フィルム (RX; 富士写真フィルム) に露光した。露光は半日程度行なった。

J. シーケンシング

単離した cDNA および遺伝子クローンの塩基配列は、Sequenase ver 2.0 Kit (USB Co., USA) によって、[35S]-dATP (800 Ci/mmol; Amersham) を用いて、ジデオキシ法で決定した (Sanger et al., 1977)。

K. 表皮細胞特異的遺伝子の単離

IFixII ベクター (Stratagene) を用いて作製されたマボヤ遺伝子ライブラリー (Kusakabe et al., 1992; 日下部岳広博士の提供) に対して、それぞれの cDNA の全長 (HrEpiB 遺伝子については A10 クローン、HrEpiD 遺伝子については C23 クローン) を鋳型としてランダムプライム法で DNA プローブを合成した。それぞれのプローブを用いて標準的な条件でスクリーニングを行い、複数のポジティブなファージクローンを得

た。それらのファージから NotI 制限酵素でゲノム断片を切り出し、遺伝子マッピングキット (Stratagene) によって制限酵素マップを作製した。cDNA クローンの 5'末端および 3'末端に特異的なプローブを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、転写の向きを決定した。5'末端を含む制限酵素断片を pBluescript II SK (+) プラスミドベクターにサブクローニングして、転写開始点の決定およびフュージョンコンストラクトの作製に用いた。

L. 転写開始点の決定

遺伝子の転写開始点は、標準的なプロトコールに従ってプライマー伸長法で決定した (Sambrook et al., 1989)。用意したプライマーは、HrEpiB 遺伝子の A10 cDNA クローンの+47 から+64 と相補的な APE オリゴヌクレオチド (5'-CCTCTTAGTCAATGACTT-3') と、HrEpiD 遺伝子の C23 cDNA クローンの+14 から+29 と相補的な CPE オリゴヌクレオチド (5'-TACTGAGCAAAACGTACG-3') である。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) によって、各々のオリゴヌクレオチドの 5'末端を[32P]-ATP でラベルした。マボヤ神経胚から抽出した 3 オ g の Poly (A) +RNA と、 1×10^5 cpm のラベルしたオリゴを 25 オ l の水に溶かした。この混合水溶液を 70°C で 10 分間インキュベートした後、緩やかに室温まで下げた。M-MLV 逆転写酵素 (Gibco BRL) と標準反応バッファーを加えて 37°C で 60 分間インキュベートした後、65°C で 10 分間熱処理した。その後 0.1 オ g の膵臓由来 RNaseA (Sigma) を加えて、37°C で 15 分間インキュベートした。最終濃度 7.5% (w/v) polyethylene glycol, 0.94M NaCl を加えて DNA 産物を沈殿させた後、沈殿物をローディング溶液 (38% formamide, 8mM EDTA, 0.02% BPB, 0.02% XC) に溶かして電気泳動をした。

M. フュージョンコンストラクトの作製

pPD1.27 プラスミドベクター (Washington Carnegie Institute の A. Fire 博士の提供) は、大腸菌由来の lac オペロンプロモーターと大腸菌由来の lacZ 遺伝子のコード領域との間にマルチクローニング部位 (MCS) および核移行シグナル (NLS) を持つ (Fire et al., 1990)。このベクターは、MCS に挿入されたプロモーターの活性によって、N 末端に NLS を持った β -ガラクトシダーゼ (NZ と略す) を産生する。

HrEpiB 遺伝子のフュージョンコンストラクト作製にあたって、まず A105 クローンのサブクローンの一つ A13 クローンから、ベクター中の SalI 部位から+200bp の KpnI 部位までの約 4.2kbp の領域を切り出した (図 20A)。この DNA 断片を klenow fragment (宝酒造) で平滑化した後、あらかじめ BamHI で切断して klenow fragment で平滑化した pPD1.27 ベクターに挿入して、pHrEpiB-NZ フュージョンコンストラクトを作った (図 21A)。このコンストラクトを HindIII で消化して-4.0kbp から-345bp の HindIII 部位まで

を除去した後、再結合して pHrEpiB(D345)-NZ を作製した (図 21B)。

HrEpiD 遺伝子のフュージョンコンストラクト作製にあたって、まず C103 クローンの転写開始点の上流-1.6kb にある EcoRI 部位から 3'末端付近の EcoRI 部位までの約 3.9kb の領域を、pBluescript II SK (+) ベクターにサブクローニングした (CE2 クローン; 図 20B)。このサブクローンの、ベクター中の SalI 部位から遺伝子内部の+103 に位置する SalI 部位までを切り出して、pPD1.27 ベクターの MCS 中の SalI 部位に挿入した (図 21C)。このコンストラクトの-166bp に位置する HindIII 部位よりも上側を HindIII 消化によって除去した後、再結合して pHrEpiD(D166)-NZ を作製した (図 21D)。

N. 顕微注入法

マボヤ受精卵へのフュージョンコンストラクトの顕微注入は、基本的には Hikosaka et al.(1993)に従って行なった。注入するプラスミドはゲノム DNA インサートの上流側のユニークな HindIII 部位 (図 21) で切断して直鎖状にした後、0.8 mM Tris-HCl, 0.08 mM EDTA, pH8.0, 1 オ g/オ l Fast Green 水溶液に溶かした。受精後の卵を、0.1% (w/v) チオグリコール酸ナトリウム (和光純薬工業、大阪), 0.05% アクチナーゼ E (科研化学、東京)を含む海水で 3-5 分程度処理して、コリオンを柔らかくした後、プラスチックペトリ皿に入れた濾過海水中のガラスカバーグラス上に置いた。この処理によってコリオンがガラス基質状に付着するようになるので、顕微注入の際に特に支持する必要がない (Hikosaka, 私信)。水平ピペットプラー (Model PG-1; 成茂科学器械研究所、東京) でキャピラリーチューブ ("Microcaps"; Drammond Sci. Co., USA) を引っ張ることにより、マイクロピペットを作製した。マイクロピペットは、シリコナイズした後、乾熱滅菌した。プラスミド溶液は、マイクロマニピュレーター (Model MN-151; 成茂科学器械研究所) を用いて実体顕微鏡下でコリオンを貫通して受精卵に顕微注入した。注入された卵は、濾過海水中で 12~13°C で発生させた。適当なステージに、Hikosaka et al. (1993) に従って胚を固定し、b-ガラクトシダーゼ活性を検出した。

O. ウェスタンブロットニング

卵、各時期の胚、遊泳幼生の凍結保存サンプルの総蛋白質を、最終濃度 0.125M Tris-Cl, pH6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0.002% BPB 水溶液に溶解させた後、SDS 変性 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。泳動後のゲル中の分離された蛋白質をドライブロットニング装置 (Model BE-500; BIOGRAFT) を用いてニトロセルロース膜 (HyBond-C; Amersham) にブロットした。ブロットニングは、0.025M Tris, 0.2M Glycine, 10% methanol 水溶液中で、250mA/65cm² で約 1 時間行なった。ブロットニング後の膜をブロッキング溶液 (5% skimmilk, 2% sodium azide 水溶液) 中で 15 分間インキュベートした後、1/1000 (v/v) PBT 希釈した 抗イヌ Sec61 N 末 ポリクローナル

抗体 (G ouch et al., 1992b; Max Derbr 歡 k Institute の E . Hartmann 博士の提供) を加えて 1 時間インキュベートした。PBT で数回洗った後、1/100 (v/v) PBT 希釈した HRP 標識-抗ウサギ IgG-2 次抗体 (NA934; Amersham) 中で 1 時間インキュベートした。PBT で 数回洗った後、ECL ウェスタンブロットングキット (Amersham) を用いてシグナルを検出した。抗体と膜をインキュベートする際には、5% skim milk および 2% sodium azide を加えて非特異的な結合をおさえた。

P. 間接蛍光抗体法

抗イヌ Sec61N 末ポリクローナル抗体による免疫組織学は、基本的に Mita-Miyazawa et al. (1987) に従って行なった。酢酸:アルコール (1:3) 混合液で固定したマボヤ胚を、1/100PBT 希釈した抗イヌ Sec61N 末ポリクローナル抗体 (ウェスタンブロットングに用いたものと同じ) およびローダミン標識-抗ラット IgG-2 次抗体を用いて間接蛍光抗体法によって染色した。抗体と胚をインキュベートする際には、0.5%ブロッキング剤 (Boehringer Mannheim) および 2% sodium azide を加えて非特異的な結合をおさえた。

結果

A. 卵割阻害1細胞胚における特異的mRNAの存在

マボヤの受精卵を第一卵割前にサイトカラシンBを含む海水中に移し卵割を継続的に阻害して育てた胚 (卵割阻害1細胞胚) は、核分裂が進行して多核細胞になり、正常胚が尾芽胚になる頃に表皮細胞の分化形質のみを発現することが知られている (Hirano et al., 1984; Nishikata et al., 1988) 。従って、卵割阻害1細胞胚は、表皮細胞分化に関与する遺伝子を発現していると期待される。もしそのような遺伝子の転写産物が卵割阻害1細胞胚の mRNA ポピュレーションにおいて大きな割合を占めて存在しているとすれば、表皮細胞特異的 cDNA を単離できる可能性も大きいと言える。そこで、まず卵割阻害1細胞胚と受精卵の mRNA ポピュレーションの違いを調べた。卵割阻害1細胞胚の Poly (A) +RNA と受精卵の Poly (A) +RNA を抽出し、[35S]-メチオニン存在下で in vitro トランスレーションを行なった。それぞれの翻訳産物を二次元電気泳動法で展開したところ、図 1 に示すように、それぞれのゲル上で約 250 個のスポットを判別することができた。これらのスポットを比較したところ、卵割阻害1細胞胚の蛋白質産物のうち約 85%は受精卵と共通の位置にあった (そのうち主要な 12 個のスポットを、図 1A と図 1B にアローヘッドで示した) 。少なくとも 3 個の主要な翻訳産物は受精卵のゲルにのみ検出された (図 1A、小矢印) 。それに対して、卵割阻害1細胞胚のゲルでは、少なくとも 9 個の受精卵には無い明確なスポットが検出された (図 1B、大矢印) 。この結果は、マボヤの受精卵が、卵割を阻害されているにも関わらず

mRNA を合成し、かつ、そのうちのいくつかは受精卵には全く存在しないものであることを示している。この結果はまた、卵割阻害1細胞胚から特異的 cDNA クローンを単離できる可能性が高いことも示しているため、そのような cDNA の単離を試みた。

B. 表皮細胞特異的遺伝子の cDNA の単離

卵割阻害1細胞胚から抽出した Poly (A) +RNA をもとにして、lgt10 ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーに対して、卵割阻害1細胞胚のトータル cDNA プローブと受精卵のトータル cDNA プローブによってディファレンシャルスクリーニングを行なった。卵割阻害1細胞胚のプローブには強いシグナルを示すが、受精卵のプローブでは検出されない cDNA クローンのみを選択し、数次のスクリーニングを繰り返した。その結果、卵割阻害1細胞胚の発生中にのみ新たに発現する mRNA の cDNA クローンが数十個得られた。そのうち任意の 10 クローンを選んでサブクローニングした後、お互いにハイブリダイゼーションを行なったところ、8 種類の独立の cDNA であることがわかった。これら 8 種類の cDNA を、仮に c1~c8 と名付けた。これら 8 種類の cDNA の長さ制限酵素マップを決定した (図 2; 表 1)。

卵割阻害1細胞胚で新たに発現するこれらの cDNA クローンが、卵割を阻害したときにのみ発現するのか、あるいは正常胚でも発現しているのかどうかを調べた。それぞれの cDNA から³²P]-dCTP でランダムプライムラベルした DNA プローブを作製し、正常尾芽胚の Poly (A)+RNA を用いてノーザンブロット解析を行なった。その結果、図 3 に示したように、8 種類の全ての cDNA クローンに対して、1 本ないし 2 本の明瞭なバンドが検出された。例えば、c1 では約 1.2kb の、c3 では約 2.3kb の単一のバンドが検出された。また、c4、c7、c8 では 2 本の異なる大きさのバンドが検出された。これらの結果は、c1~c8 の 8 種類の cDNA クローンに対応する mRNA が正常尾芽胚で発現していることを示している。次に、これら 8 種類の cDNA クローンに対応する mRNA がどの組織で発現しているのかを調べるために、ディゴキシジェニンでラベルした DNA プローブを作製し、正常尾芽胚のホールマウント in situ ハイブリダイゼーションを行なった。この実験系では、ハイブリダイゼーションシグナルは抗ディゴキシジェニン二次抗体に結合しているアルカリフォスファターゼによる触媒反応によって青色の染色として検出される。ホールマウントでハイブリダイゼーションを行うと、いずれも胚全体が青色に染まったように見えた (例えば、図 4A; c4 プローブ)。そこで、染色された胚を切片にして観察しなおしたところ、図 4D-K に示したように、8 種類全てのプローブに対して表皮細胞のみでシグナルが検出され、筋肉・脊索・内胚葉・間充織といった組織では全くシグナルが検出されなかった。コントロールとして、プローブなしで二次抗体のみを反応させてもシグナルは検出されなかった (図 4B)。また、別のコントロールとして筋肉ミオシン重鎖特異的プローブ (Makabe et al., 1990) を用いると筋肉細胞でのみシグナルが検出されたので、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション

オンにおける表皮細胞の特異的染色はプローブの浸透性にもとづくものではない。これらの実験結果は、卵割阻害1細胞胚から単離された8種類のcDNAクローンに対応するmRNAがすべて正常尾芽胚において発現していることを示し、かつ、これらのmRNAは表皮細胞でのみ特異的に発現していることを示している。これら8種類のcDNAがゲノム中でどのように存在しているのかを調べるために、マボヤ卵巢由来ゲノムDNAを用いてゲノミックサザンブロット解析を行なった。その結果、これら8種類のcDNAプローブによって検出されるバンドのパターンは全て異なっていることがわかった(図5)。従って、これら8種類のcDNAは、異なる8種類の遺伝子の転写産物に対応するものである可能性が高い。よってこれらのc1~c8のcDNAに対応する8種類の遺伝子を、仮にc1遺伝子~c8遺伝子と呼ぶことにした。

C. 表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現様式の解析

c1~c8の8種類の表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現様式を知るために、卵、各発生段階の胚、幼生、幼若個体から抽出したPoly(A)+RNAを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行なった。その結果8種類の遺伝子は、それぞれ異なる時間的発現様式を示し、これらの発現様式は次に示す4タイプに分類できることがわかった(表1; 図6)。

c5遺伝子はタイプ1に分類された(図6A)。受精卵および初期胚にはシグナルは検出されなかったが、囊胚期に3.0kbの弱いバンドが現れた。神経胚期以後になると急激に転写産物の量が増加した。尾芽胚を経て、遊泳幼生になると転写産物は減少していき、変態開始後は全く検出されなくなった。従って、このタイプの遺伝子の転写活性はサイゴティックであると思われる。転写産物の変態開始後に消えることから、このタイプの遺伝子産物は幼生の表皮細胞および幼生被囊の形成にのみ必要なものであるかもしれない。その他の2つの遺伝子、c4とc7もこのタイプの発現様式を示した(data not shown)。

3つの遺伝子、c1、c6、c8はタイプ2に分類された。タイプ1と同様に、c1遺伝子の転写産物は受精卵および初期胚ではシグナルは検出されなかった(図6B)。囊胚期に1.2kbの弱いバンドが現れ、神経胚期以後になると急激に転写産物量が増加する点もタイプ1と同様であった。しかし、尾芽胚から遊泳幼生を経て幼若個体になってもずっと転写産物が存在し続ける点で、タイプ1とは異なっていた。このタイプの遺伝子では囊胚期から変態を経て幼若個体になっても転写産物があるので、幼生の表皮のみならず、幼若個体および成体の表皮細胞の形成にも何らかの役割を果たしていると考えられる。残りの2つの遺伝子、c2遺伝子(図6C)とc3遺伝子(図6D)は、それぞれタイプ3とタイプ4に分類された。これら両タイプでは、予期せぬことに受精卵および初期胚でもごく僅かに転写産物が検出され、囊胚期になって転写産物の量が顕著に増加することがわかった。したがって、これら2つの遺伝子には、母性の転

写活性とザイゴティックな転写活性とがあると考えられる。c2 遺伝子の mRNA は変態開始後に速やかに消失するのに対して、c3 遺伝子のほうは幼若個体になってもずっと存在し続けた。以上の結果をまとめると、マボヤ胚の表皮細胞に特異的な 8 つの遺伝子の転写産物の時間的出現・消長様式は、(1) 未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に初めて現れて変態開始後消える、(2) 未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に現れ変態開始後も存在する、(3) 未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後に消える、(4) 未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後も存在し続ける、という 4 つのタイプに分類された。そこで、この 4 タイプのそれぞれの代表となる遺伝子、順に c5、c1、c2、c3 を選んで、それぞれ HrEpiA、HrEpiB、HrEpiC および HrEpiD 遺伝子と名付け、これら 4 つに絞ってさらに研究を進めることにした。

D. 表皮細胞特異的遺伝子の cDNA クローンの再単離と塩基配列の解析

1. 囊胚からの cDNA クローンの再単離

これら 4 つの遺伝子の転写調節の研究を行うためには、それぞれの遺伝子を単離しなければならない。そのためにはまず正常胚から mRNA の全長に近い cDNA を単離する必要がある。そこで、卵割阻害 1 細胞胚から得られた 4 タイプの cDNA (c5, c1, c2, c3) をプローブとして正常囊胚の cDNA ライブラリーからそれぞれの遺伝子の cDNA をスクリーニングした。得られたクローンの内、最長のものをそれぞれの遺伝子の cDNA の代表とした。HrEpiA, B, C, D 遺伝子のそれぞれに対して得られた cDNA クローンの名前は、順に E35, A10, B21, C23 である。図 7 に各 cDNA の制限酵素マップを示した。このうち A10 と C23 は、それぞれの遺伝子の mRNA の長さと同様であったので塩基配列を完全に決定し、翻訳産物の予測を行なった。HrEpiA 遺伝子の E35 cDNA クローンと HrEpiC 遺伝子の B23 cDNA クローンについても塩基配列を決定したが、いずれも 5'側の数百塩基が欠如しているようであり、翻訳産物に関する情報はまだ確実なものにはなっていない (data not shown)。

2. HrEpiB 遺伝子の cDNA の解析

図 8A に示したように、HrEpiB 遺伝子の A10 cDNA クローンは全長が 1152 塩基対であった。この cDNA クローン中には、最初の ATG コドンから始まる 726 塩基の ORF と、374 塩基の 3'-非翻訳領域と、21 塩基の Poly(A)tail が見いだされた。この ORF から予想される翻訳産物の全長は、241 アミノ酸であった。この配列をもとにして、PIR および SWISSPROT の両者の蛋白質配列データベースを FASTA プログラム (Pearson and Lipman, 1988) を用いてホモロジー検索をした。その結果 A10 cDNA から予想されるアミノ酸配列は、UDP glucose-4 epimerase (例えば、Citron and Denelson, 1984; Zeschnigk et al., 1990) 、および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase (例えば、Zhao et al., 1989; Lorence et al., 1990) とある程

度の相同性を示すことがわかった。これら三者の間の相似性は特にN末において顕著であった(図 8B)。それ以外の領域では、保存されている残基が散見されるが、A10 から予想される配列が特にどちらかと似ているということはない。3. HrEpiD 遺伝子の cDNA の解析 HrEpiD 遺伝子の cDNA クローン (C23) は全長が 2062 塩基対で、1428 塩基対の ORF を含んでいると予想された(図 9)。この ORF は 51 番目に位置する最初の ATG コドンから TAG コドンまでの、475 アミノ酸をコードしていた。予想される蛋白質の分子量は、52,472Da であった。図 10 に示すように、C23 cDNA から予想される HrEpiD 遺伝子産物のアミノ酸配列は、哺乳類の Sec61 遺伝子産物および酵母の SEC61 遺伝子産物と、非常に高い相同性を示した。全長のアミノ酸配列を比較すると、ホヤの HrEpiD 遺伝子産物とイヌの Sec61 遺伝子産物との間では 87.2% が一致していた。また、ホヤと酵母の SEC61 遺伝子産物の間でも、54.8% が一致していた。特に、ホヤとイヌの間では疎水性プロットが非常によく似ていた(図 11)。哺乳類の Sec61 遺伝子産物は膜を 10 回貫通すると予想されているが (G 嗽 lich et al., 1992b)、HrEpiD 遺伝子産物も同様に膜を 10 回貫通することが予想される(図 10,11)。これらの結果から、HrEpiD 遺伝子産物はマボヤにおける SEC61/Sec61 遺伝子のホモログの一つといえる。そこで、HrEpiD 遺伝子をマボヤ *H. roretzi* における SEC61 ホモログ、すなわち HRSEC61 と名付けた。

SEC61/Sec61 遺伝子産物は原核生物の SecY 蛋白質ともアミノ酸配列の相同性が高く、G 嗽 lich et al.(1992b) は特に相同性の高い3つの領域があることを指摘している。マボヤの HrEpiD (HRSEC61) 遺伝子産物も、それらの3つの領域において種間で保存されているアミノ酸残基を共有していた(図 12A)。さらに、既知の Sec61/SecY 蛋白質のアミノ酸配列の全長を用いて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による分子系統樹を作製した(図 12B)。その結果、真核生物の中で2種の脊椎動物とマボヤとが一つの系統群を形成することがわかった。SEC61/Sec61 遺伝子産物は、真核生物において粗面 ER 膜状に存在する膜貫通蛋白質で、膜表面のリボソームで合成された新合成ペプチドを ER 内腔に輸送する複合体の機能にとって必須の蛋白質である。その輸送メカニズムは、原核生物の細胞膜での、SecY 遺伝子産物を中心とする蛋白質複合体による蛋白質輸送と、進化的に高度に保存されている (Hartmann et al., 1994)。そのような必須の蛋白質の mRNA が、マボヤ胚において表皮細胞にのみ特異的に発現しているという事実は興味深い。そこで HrEpiD (HRSEC61) 遺伝子の発現様式について詳しく解析した。

E. HrEpiD/HRSEC61 遺伝子の発現様式

1. mRNA の発現様式

C23 cDNA クローンの全長をプローブとして用い、胚発生の各段階のサンプルに対してホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果から、HrEpiD (HRSEC61) 遺伝子の mRNA は初期胚においてごく僅か存在していることがわかっている (図 6D)。受精卵および初期卵割期の胚では全体に弱いシグナルが検出されたが、特にある領域に局在するという事はなかった (data not shown)。神経胚 (図 13A) および尾芽胚 (図 13A,D) では、表皮細胞でのみシグナルが検出された。発色反応後の尾芽胚を切片にして観察しなおしたところ、c4 cDNA クローンを用いた場合 (図 4G) と同様に、内部の筋肉や内胚葉や脊索といった組織ではシグナルは検出されなかった。また、32 細胞期から卵割を阻害して育てた胚を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、動物半球の予定表皮細胞でのみ発現が検出された (図 13E,F)。

2. 蛋白質の発現様式

すでに述べたように Sec61 蛋白質は ER の機能に必須な蛋白質であるが、このような遺伝子のザイゴティックな転写産物の特異的な発現から、マボヤ胚における Sec61 蛋白質もそれに応じて不均一な分布をしていることが期待される。脊椎動物ではすでに Sec61 蛋白質の解析が進んでおり、イヌの Sec61 蛋白質に対する抗体を用いた実験が報告されている (G 嗽lich et al., 1992a)。その実験で用いられた抗体は、イヌの Sec61 蛋白質の N 末の 13 アミノ酸 (MAIKFLEVIKPFK; 図 10) と同じ配列の合成ペプチドを抗原としてラットに免疫して得られた抗血清を、同じ合成ペプチドでアフィニティ精製して得られたポリクローナル抗体である。これに対応する部分のマボヤ HrEpiD/HRSEC61 遺伝子産物のアミノ酸配列は「MGFKFLEVIKPFK」であることから、このポリクローナル抗体がマボヤの Sec61 蛋白質と反応することが期待された。そこでこの抗体を Max Derbr 歡 k Institute の E. Hartmann 博士に提供願い、それを用いてマボヤ受精卵、胚、幼生の総蛋白質に対する免疫ブロット解析を行なった。その結果、全ての時期で 68kDa と 92kDa の 2 本の明瞭なバンドが検出された (図 14)。受精卵における 92kDa のバンドは、他の時期のものに比べて弱かった。次に同じ抗体を用いて、受精卵および各発生段階の胚の切片標本に対する免疫組織染色を行なった。受精卵では卵全体で網目状の分布が見られた (図 15A)。染色性は 8 細胞胚では全ての割球で核の周辺に分布するが、A4.1 割球対では他と比べて少ない (図 15B)。囊胚では、予定表皮細胞に強い染色が見られる他、予定筋肉細胞でも染色が見られた (図 15C)。神経胚および尾芽胚では、表皮細胞で強い染色が見られる他、筋肉や間充織で比較的強い発現が見られた (図 15D-F)。以上の結果から、Sec61 蛋白質は囊胚期以後マボヤ胚において全ての組織に均等に分布するわけではないこと、染色性は表皮細胞が最も強いが筋肉と間充織でも染色性が検出されることが示唆された。転写産物と蛋白質の発現様式を合わせて考えると、囊胚期以後は表皮細胞では mRNA を盛んに合成し蛋白質を大量に生産しているが、その他の間充織や筋肉では僅かに存在している mRNA を翻訳しているということが示唆される。

F. 特異的遺伝子レベルでの表皮細胞分化の自立性の証明

マボヤの単離割球から発生した部分胚や卵割阻害胚においては、いくつかの組織の分化マーカーが細胞系譜に沿って自律的に発現することが知られている（例えば、Nishikata et al., 1988; Nishikata and Satoh, 1990; Makabe et al., 1992; Nishida, 1992a）。表皮細胞分化については2種類の抗体をマーカーとした実験で自律的分化が起こることが Nishikata et al. (1987) によって証明されているが、遺伝子の転写レベルでの研究は皆無であった。そこで、本研究において単離した8種類の表皮細胞特異的遺伝子のうち、ザイゴティックにのみ発現する HrEpiA と HrEpiB の2つの遺伝子を選び、マボヤの卵割阻害胚および単離割球から発生した部分胚を用いて、表皮細胞分化の自律性を遺伝子レベルで検証することを試みた。実験に先立って、あらためて再単離した cDNA (HrEpiA 遺伝子には E35 クローン、HrEpiB 遺伝子には A10 クローン) の全長をプローブとして、切片およびホールマウントのサンプルに対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行ない、その特異性を確認した。その結果、切片およびホールマウントの両者のサンプルにおいて、これら2つの遺伝子は表皮細胞に特異的であり、その他の組織では発現が検出されなかった (図 16)。1. 部分胚における HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の自律的発現 表皮細胞特異的遺伝子の自律的発現を検証するための実験手順を図 17 にまとめて示した。第 1 卵割面は胚の左右対称面と一致する。従って 2 細胞期の左と右の割球は同じ発生能力を受け継ぐ (図 17B)。図 18 および表 2 に示したように、半胚のうちほとんど (51/53) で HrEpiA 遺伝子の mRNA が発現していた。また、HrEpiB 遺伝子産物は全ての半胚 (55/55) で発現した (表 2)。

第 2 卵割面は第 1 卵割面と直交し、前半分 (A3+A3) と後ろ半分 (B3+B3) を分けるが (図 17C)、細胞系譜などの研究からすでにこの卵割で前半分と後ろ半分では発生能力に違いが生じることがわかっている (Satoh, 1994 の総説を参照)。しかし、表皮細胞の発生運命は、前と後ろの両方に分配される。図 18B と 18C に示したように、表皮細胞特異的遺伝子の発現は、A3 半胚 (HrEpiA の場合 19/26, HrEpiB の場合 19/23) でも B3 半胚 (HrEpiA の場合 31/32, HrEpiB の場合 15/18) でも明らかであった。

第 3 卵割面は胚を動物極側と植物極側に分け、表皮細胞の発生運命は動物半球の 4 つの割球にのみ分配される。図 17D に示したような 4 つの割球対のそれぞれに由来する 1/4 胚では、表皮細胞特異的遺伝子の mRNA の発現は a4.2 部分胚と b4.2 部分胚でのみ検出された。HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の発現は、a4.2 部分胚ではそれぞれ 45/53 と 58/68 であり、b4.2 部分胚ではそれぞれ 44/53 と 79/85 であった (図 18D,E; 表 2)。それに対して、A4.1 部分胚と B4.1 部分胚では、HrEpiA と HrEpiB 遺伝子とも全く発現しなかった (図 18F, G; 表 2)。2. 卵割阻害胚における HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の自律的発現次に、卵割阻害胚においても同様に表皮細胞特異的遺

伝子の発現を調べた。図 17 に示したようにこの一連の実験においては、1 細胞期に直ちに卵割阻害するか、あるいは 2~8 細胞胚のそれぞれの時期に割球あるいは割球対を単離し、単離直後に卵割を阻害した。そのまま約 20 時間育てた後、HrEpiA と HrEpiB 遺伝子の mRNA の発現をホールマウント in situ ハイブリダイゼーションで調べた (図 19; 表 3)。

卵割阻害 1 細胞胚においては、36/45 で HrEpiA が発現していた (図 19A; 表 3)。ハイブリダイゼーションシグナルは胚全体で検出された。2 細胞期に単離して卵割阻害した AB2 または AB2 半胚では、27/35 で HrEpiA 遺伝子の mRNA が検出された。A3 および B3 割球対に由来する半胚では、それぞれ 10/14 と 13/14 で検出された (図 19B,C)。さらに、8 細胞期の a4.2 割球対に由来する 1/4 胚では 20/21 で、b4.2 割球対に由来する 1/4 胚では 17/19 で HrEpiA 遺伝子が発現していた (図 19D,E)。一方、細胞系譜から期待されたとおり、A4.1 と B4.1 割球対に由来する 1/4 胚では、HrEpiA 遺伝子の発現は全く検出されなかった (図 19F,G)。

同様の結果は、HrEpiB 遺伝子の発現に関しても得られた (表 3)。しかしながら、4 細胞期に単離して卵割阻害した胚においては、発現している胚の割合が他に比べて若干低かった。

G. 遺伝子の単離と構造解析

さて、HrEpiB と HrEpiD の 2 つの表皮細胞特異的遺伝子に関しては、mRNA のほぼ全長に相当する cDNA クローンを単離し、その塩基配列を決定できたので、マボヤゲノムライブラリーからこれらの 2 つの遺伝子の単離を試みた。スクリーニングの結果、HrEpiB のプローブにハイブリダイゼーションするゲノムクローンを 3 個と、HrEpiD のプローブとハイブリダイゼーションするクローンを 5 個得ることができた。図 20A に示したように、HrEpiB 遺伝子の 3 つのクローンは互いにオーバーラップして 15.9 kb のゲノム領域をカバーしていた。常法に従ってまず、制限酵素マップの作製と、cDNA 断片のプローブを用いた転写領域の決定を行なった。次に、cDNA の 5'末端を含む制限酵素断片をサブクローニングし、プライマー伸長法によって転写開始点を決定した。転写開始点付近の塩基配列を部分的に決定したところ、その配列は cDNA のものとほとんど一致した。HrEpiD 遺伝子の 5 つのクローンについて、HrEpiB 遺伝子と同様に、制限酵素マップの作製、転写領域の決定、転写開始点の決定を行なった。そのうち 4 つのクローンは、互いに重なり合って 19.7 kb のゲノム領域をカバーしていた (図 20B)。もう一つのクローン(C107)は、転写開始点付近の塩基配列は他のものとほとんど同じであったが制限酵素マップが少し異なっていた (data not shown)。図 5 に示したゲノムサザンハイブリダイゼーションの結果から、HrEpiD 遺伝子に類似した配列がゲノム中に存在している可能性が高いので、このクローンは HrEpiD 関連遺伝子を含むのかもしれない。C107 を含む 5 クローンの、cDNA の 5'末端付近に相当する

部分の塩基配列は互いにほとんど同じであり、かつ cDNA とほとんど一致していた。更に解析を続けるために、各々の遺伝子の代表として、HrEpiB 遺伝子には A105 クローンを、HrEpiD 遺伝子には C103 クローンを選んだ。H. HrEpiB 遺伝子のプロモーター領域の機能解析 まず HrEpiB 遺伝子の転写調節領域を解析するために、上流側の-4.0kb までを含むプロモーター領域を、核移行シグナルを持つ lacZ レポーター遺伝子 (NZ) に結合したフュージョンコンストラクトを作製した (pHrEpiB-NZ; 図 21A)。このコンストラクトでは、HrEpiB 遺伝子の翻訳開始点の下流 (+200) にある KpnI 部位に、核移行シグナルがフレームシフトすることなく結合しているので、HrEpiB 遺伝子自身の翻訳開始コドンが使用されると期待された。マボヤの受精卵は直径が約 280 μm である。媒精後 30~90 分の間に、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の直鎖状にした pHrEpiB-NZ コンストラクト溶液を約 1.8nl 顕微注入した。この溶液の量は受精卵の体積の約 16%に相当し、注入されたプラスミドの分子数は約 100 万コピーである。平均すると顕微注入された受精卵のうち約 50%が正常な形態の胚に発生したが、正常形態率は卵のバッチによってかなり開きがあった。本研究においては、正常な形態の尾芽胚に発生した場合のみをカウントした。DNA を注入しなかった対照胚では、内在性の β -ガラクトシダーゼ活性は検出されなかった。pHrEpiB-NZ を注入された卵から発生した正常な形態の尾芽胚のほとんどで、表皮細胞の核において β -ガラクトシダーゼ活性が検出された (図 22A)。調べた限りの実験胚において、筋肉、脊索、内胚葉、間充織といった内部の組織での β -ガラクトシダーゼによる染色は見られなかった。 β -ガラクトシダーゼを発現している表皮細胞が多くの場合クラスター状に存在していたことから、注入されたコンストラクトの DNA がモザイク状に特定の系列の表皮細胞に入っていたことが示唆される。複数の実験胚のモザイク状のパターンを重ね合わせて考えると、ある特定のサブグループでのみ β -ガラクトシダーゼ活性が検出されるということはないので、胚によって卵割ごとにランダムに DNA が分配されていった結果であると考えられる。いくつかの場合では、 β -ガラクトシダーゼ活性がほとんど全ての表皮細胞で観察された。さらに調節領域を限定するために、pHrEpiB-NZ プラスミドの上流側を短く削り、HrEpiB 遺伝子の転写開始点から-345 塩基までのみを含む pHrEpiB(D345)-NZ フュージョンコンストラクトを作製した (図 21B)。このコンストラクトを直鎖状にして受精卵に導入して尾芽胚期まで育てると、 β -ガラクトシダーゼ活性は表皮細胞の核においてのみ検出された (図 22B)。レポーター遺伝子の発現は、pHrEpiB-NZ の場合と同様に、筋肉、脊索、内胚葉、間充織といった内部の組織では認められなかった。したがって、HrEpiB 遺伝子の-345 から+200 までの約 550 塩基対の短いプロモーター領域は尾芽胚の表皮細胞での組織特異的発現に関与していると考えられる。pHrEpiB(D345)-NZ を注入された胚では、初期囊胚期以前では β -ガラクトシダーゼ活性は検出されなかったが、後期囊胚になって初めて表皮細胞の細胞質で検出された (data not shown)。神経胚期には β -ガラクトシダーゼ活性が核に蓄積していた (data

not shown)。ノザンプロット解析によると HrEpiB 遺伝子の mRNA は囊胚期に初めて検出されるので (図 6B)、内在性の HrEpiB 遺伝子とほぼ同じ時期に、導入したコンストラクトが転写活性化され、ただちに翻訳も起こっていると考えられる。これらの結果から、この-345 から+200 までの約 550 塩基対の短いプロモーター領域が HrEpiB 遺伝子の適切な時間的調節に必要な情報を含んでいることが示唆される。

I. HrEpiD 遺伝子のプロモーター領域の機能解析 HrEpiD 遺伝子の融合コンストラクト (pHrEpiD-NZ; 図 21C) では、転写開始点を+1 として、-1.6kbp から+101bp までのゲノム領域が pPD1.27 ベクターの核移行シグナルに結合されている。このコンストラクトを顕微注入した受精卵から発生した尾芽胚では、b-ガラクトシダーゼ活性は表皮細胞の核でのみ検出された(図 23A)。HrEpiB 遺伝子の場合と同様に、内部の組織での発現は見られず、また、表皮細胞の一部でクラスター状に染色が見られた点も同じであった。上流側を除いて短くしたコンストラクト (pHrEpiD(D166)-NZ; 図 21D) を導入した受精卵から発生した尾芽胚でも、同様に表皮細胞の核でのみ b-ガラクトシダーゼの活性が認められた (図 23B)。従って、HrEpiD 遺伝子の-166 から+108 までのプロモーター領域は尾芽胚の表皮細胞での組織特異的発現に関与していると考えられる。pHrEpiD(D166)-NZ を注入された胚では、神経胚になって初めて b-ガラクトシダーゼ活性が表皮細胞の細胞質で検出された (data not shown)。ノザンプロット解析によると HrEpiD 遺伝子の mRNA は囊胚期にザイゴティックな転写の活性化が起こって蓄積し始めるので (図 6D)、この内在性の HrEpiD 遺伝子の転写活性化の時期からやや遅れてこのコンストラクトの翻訳が起こっているようである。この遅れはおそらくこのコンストラクトが HrEpiD 遺伝子自身の翻訳開始点を含まないことによると思われるので、この-166 から+108 までの短いプロモーター領域は HrEpiD 遺伝子の適切な時間的調節に必要な情報を含んでいると考えられる。

J. 2つの表皮細胞特異的遺伝子のプロモーター領域の塩基配列の比較 以上の結果から、HrEpiB 遺伝子の-345 から+200 の領域および HrEpiD 遺伝子の-166 から+108 までの領域は、それぞれの遺伝子の胚の表皮細胞での特異的発現を担う情報を含んでいることがわかった。また、囊胚期での転写活性化に必要な因子もこれらの領域に含まれていると考えられる。従ってこれらの領域には表皮細胞での空間的・時間的に特異的な転写活性化を担うシスエレメントが含まれていると考えられる。そのようなシスエレメントは、2つの遺伝子に共通のものである可能性がある。そこで、これらの領域の塩基配列を決定し、比較した (図 24,25)。ホヤ以外の生物も含めて、多くの遺伝子において転写開始点の上流側に転写調節に関わるシス因子が存在していることが報告されているので、本研究においては転写開始点よりも上流側のみを用いて比較を行なった。まず、それぞれの配列を用いて、転写因子結合配列データベース (TFD ver.7.2; Ghosh, 1993) を検索した。その結果、両遺伝子の上流に、Engrailed 結合配列、bHLH 結合配列 (E-box)、GATA-1 結合配列、SP-1 結合配列といったいくつかのモチーフがあること

がわかった（図 24.25 の太線で示した塩基配列）。例えば Engrailed 結合配列は HrEpiD 遺伝子上流の-149bp の位置に見られる。一方これによく似た配列は、HrEpiB 遺伝子上流の-233bp の位置にあるが、コンセンサス配列に完全に一致する配列ではない。このように一方の遺伝子にのみ見いだされるシスエレメントは、それを含む遺伝子の特異的な制御に関わっている可能性がある。逆に、例えば GATA-1 結合配列は HrEpiB と HrEpiD の両方に共通に見いだされる配列であり、両者に共通の転写制御に関わっている可能性がある。また既知の転写因子結合配列に限らずに、これら 2 つの遺伝子に共通に含まれる 6 塩基以上の共通の配列を検索したところ、17 種類に分類できる塩基配列モチーフが見いだされた（E1-E17; 図 24 の四角で囲んで示した塩基配列）。そのような両者に共通に含まれる塩基配列は、2 つの遺伝子に共通な転写制御に関わっている可能性がある。このような共通および非共通の塩基配列モチーフ実際にマボヤ胚の表皮細胞における転写活性化において機能しているかどうかは、今後の課題である。

考察

本研究においては、まず、マボヤ胚の表皮細胞で特異的に発現する 8 種類の異なる遺伝子の cDNA クローンを単離した (Ueki et al., 1991)。これはホヤにおける初めての表皮細胞特異的遺伝子マーカーの単離であり、既に cDNA の単離が報告されている筋肉特異的遺伝子マーカーであるアクチン (Tomlinson et al., 1987a; Kusakabe et al., 1991) およびミオシン重鎖 (Makabe et al., 1990)、脊索特異的マーカーである As-T 遺伝子 (Yasuo and Satoh, 1993; Yasuo and Satoh, 1994)、神経細胞特異的マーカーである Na チャンネル蛋白質遺伝子 (Okamura et al., 1994) と合わせて、ホヤ胚における細胞分化の研究を遺伝子の転写調節のレベルで進める上での重要な進歩であると考えられる。これらの組織特異的マーカーの遺伝子は既に単離されており、プロモーター領域の機能解析が進んでいる (Kusakabe et al., 1992; Hikosaka et al., 1993, 1994; Kusakabe, 私信; Araki, 私信; Yasuo, 私信)。本研究において単離した 2 つの表皮細胞特異的遺伝子と合わせて、マボヤ胚の複数の組織のそれぞれで特異的に発現している遺伝子上流調節領域のシスエレメント、あるいはそこに結合して働くトランスエレメントを比較することによって、ホヤ胚における組織分化の分子機構を統合的に解明できる可能性がある。A. マボヤ卵割阻害 1 細胞胚における表皮細胞の分化形質の特異的発現 本研究より以前に Nishikata et al. (1988) によって 2 種類のマボヤ胚表皮細胞特異的モノクローナル抗体が単離されている。これら 2 種類の抗体の認識する抗原分子は未だ不明であるが、卵割阻害胚および単離割球由来の胚において表皮細胞の細胞系譜に従って自律的に発現することが知られている。また、マボヤ卵割阻害 1 細胞胚においては表皮細胞の特異的形質の一つである被嚢形成も行われることが知られている。さらに、Hirano et al. (1984) によって、卵割阻害

1細胞胚の細胞膜の電気生理学的性質は表皮細胞のものと一致することが報告されている。以上のような知見から、マボヤの卵割阻害1細胞胚は表皮細胞特異的分化マーカーのみを発現することが示唆されていた。そこで、本研究においては表皮細胞特異的遺伝子の cDNA の単離を目的として、まず卵割阻害1細胞胚の発生中に発現している mRNA の cDNA を 8 種類単離した。正常尾芽胚を用いたノザンハイブリダイゼーションおよび in situ ハイブリダイゼーションによって、これら 8 種類の cDNA に対応する RNA は全て正常尾芽胚の表皮細胞で発現していることがわかった。すなわち、単離した 8 種類の cDNA がすべて表皮細胞に特異的であったということは、マボヤの卵割阻害1細胞胚が表皮細胞としてのみ分化しているという仮説を強く支持する。一方、カタユレイボヤ *Ciona intesinalis* では、卵割阻害1細胞胚において表皮細胞の形質のみでなく筋肉、脊索、内胚葉、神経の形質も分化することが示されている (Whittaker, 1973b, 1977; Crowther and Whittaker, 1986)。種によって卵割阻害1細胞胚において発現する分化形質が異なるのは、それぞれの種における細胞分化の制御機構の違いを反映しているのかもしれない。マボヤでは表皮細胞の形質のみが排他的に発現していることから、他の組織特異的遺伝子の負の制御因子が存在している可能性がある。これらは今後研究すべき課題といえる。

B. 胚および幼若個体における表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現様式 胚及び幼若個体の RNA に対するノザン解析の結果、本研究において単離した表皮細胞特異的な 8 種類の cDNA に対応する遺伝子の転写産物の時間的発現様式は、(1) 未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に初めて現れて変態開始後消える、(2) 未受精卵および初期胚には存在せず、囊胚期に現れ変態開始後も存在する、(3) 未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後に消える、(4) 未受精卵および初期胚にわずかに存在し、囊胚期に増加して変態開始後も存在し続ける、という4つのタイプに分類されることがわかった。タイプ1とタイプ3の遺伝子は、変態開始後に速やかに転写産物が消失するので、幼生の表皮細胞および被囊の形成に必要なものと考えられる。それに対して、タイプ2とタイプ4の遺伝子では囊胚期から変態を経て幼若個体になっても転写産物が存続するので、幼生の表皮のみならず、幼若個体の表皮細胞の形成にも何らかの役割を果たしていると考えられる。ホヤ胚の発生においては、表皮細胞が幼生型被囊と幼若個体型被囊を形成する (Cloney, 1990; Satoh, 1994 の総説を参照)。外側の幼生型被囊は幼生の全表面を覆い、内側の幼若個体型被囊は胴体部分のみを覆っている。変態時に幼生型被囊は脱ぎ捨てられる。in situ ハイブリダイゼーションで調べると、これら4タイプの8種類の遺伝子はいずれも胴体部分のみではなく尾芽胚全体の表皮細胞で均一に発現しており、発現の部域差は特に認められなかった。したがって、これらの遺伝子は異なる種類の被囊の違いを生じる過程に関わっているものではないようである。本研究でもちいたスクリーニング方法では、変態後の成体型の表皮でのみ発現する遺伝子を単離することはできない

が、もしそのような遺伝子が存在するならば、新たなスクリーニング法を開発したいと考えている。これに関連して *Molgula* 属のホヤには通常のおタマジヤクシ型幼生を経て変態を行なう有尾種の *M. oculata* と、尾部を形成しない無尾種の *M. occulta* がある。無尾種では孵化前と後で巨視的には表皮細胞および被囊の違いは認められない。しかし電子顕微鏡による観察から、無尾種の孵化後幼生には幼若個体型の被囊しかないことがわかっている (Hirose and Kusakabe, 私信)。従って、無尾種の表皮細胞が幼生型被囊を作る能力を持っていない可能性があり、有尾種と無尾種の表皮細胞には遺伝子レベルでの違いがあると考えられるので、今後の研究課題としたい。最初のディファレンシャルスクリーニングではこれら 8 つの cDNA クローンは受精卵のプロープに対してネガティブなシグナルを示した。従って、受精卵にはこれらの mRNA が存在していないことが期待された。しかし、実際にはノザンブロットによって 2 つの cDNA に対応する転写産物が受精卵にも存在することがわかった。この理由は、ディファレンシャルスクリーニングに用いたトータル cDNA プロープの検出感度が、鋳型とした Poly(A)+RNA 全体の種類と量を反映するものであるために、ノザンハイブリダイゼーションに用いた cDNA プロープの検出感度よりも低いからであると考えられる。また、今回はノーザンブロットハイブリダイゼーションで各遺伝子の転写産物の量を調べた結果からその発現様式を分類した。しかし、ノザンブロット法でわかるのは各々の発生段階において細胞内に蓄積している転写産物の量だけで、その時期の転写活性がどの程度であるかということとはわからない。例えば、mRNA の寿命が長い場合には、転写活性を正しく反映しない恐れがある。核ラン-オフ-アッセイ法などにより、転写活性を調べることにより、厳密に転写様式を決定できると考えられる。ホヤ胚の神経管形成は、脊椎動物と同様に、胚の背側にできる神経板の両端がもちあがって丸くなることによっておこる (Kowalevsky, 1866; Conklin, 1905b; Satoh, 1978; Nishida, 1986)。ホヤの中樞神経系は 8 細胞胚の a4.2 と b4.2 と A4.1 の 3 組の割球対に由来するが、a4.2 に由来する神経細胞の分化には A4.1 からの誘導が必要である (Rose, 1939; Reverberi and Minganti, 1946, 1947)。最も研究が進んでいるのは、2 つの色素細胞、すなわち眼点と平衡器である。単離割球を組み合わせた実験から、A4.1 の子孫のうち予定内胚葉と予定脊索細胞と予定神経管細胞のみが色素細胞を誘導する能力を持つことが示されている (Reverberi et al., 1960; Nishida, 1991)。また、110 細胞期の予定色素細胞を単離しても表皮細胞には分化しないことから、その誘導は許可的で、囊胚中期に起こることが示唆されている (Nishida, 1991)。その時期に表皮細胞で発現している遺伝子が神経誘導にどのように関わっているかという点は非常に興味深い。C.マボヤ胚における SEC61 遺伝子ホモログの発現様式 今回単離した 8 つの表皮細胞特異的遺伝子の一つ HrEpiD 遺伝子は、その cDNA から予想されるアミノ酸配列にもとづいて、マボヤにおける SEC61/Sec61 遺伝子ホモログであることがわかった。結果の項でも述べたように、SEC61/Sec61 遺伝子産物は、真核生物に

において粗面 ER 膜状に存在する膜貫通蛋白質で、膜表面のリボソームで合成された新合成ペプチドを ER 内腔に輸送する複合体の機能にとって必須の蛋白質である。そのような必須の蛋白質の mRNA が、マボヤ胚において表皮細胞にのみ特異的に発現しているという事実は非常に興味深い。HrEpiD (HRSEC61) 遺伝子の mRNA の発現様式は、受精卵および初期胚において母性の転写産物が僅かに存在するが特に局在していないこと、神経胚以後は表皮細胞のみでシグナルが検出されることが本研究において示された。表皮細胞以外でシグナルが検出されなくなるのは、転写産物が消失するか、あるいは表皮細胞に比べて非常に量が少なくてバックグラウンドレベルにしか見えなくなるということが考えられる。HrEpiD 遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子に結合したフュージョンコンストラクトを受精卵に注入すると、囊胚期以後に表皮細胞でのみレポーター遺伝子が発現することから、この遺伝子のザイゴティックな転写は表皮細胞でのみ起こることが確かめられた。イヌの Sec61 遺伝子産物の N 末部分に対するポリクローナル抗体は、受精卵から幼生までの各ステージにおいて、ウェスタンブロットで 68kDa と 92kDa の 2 本の明瞭なバンドを検出した。これら 2 本のバンドが両方とも本当にマボヤの SEC61/Sec61 蛋白質なのかどうかは確かめていないが、免疫原としたアミノ酸の配列が非常に似ていることから、おそらく SEC61/Sec61 蛋白質を認識していると考えている。この抗体の認識する抗原は、受精卵では卵全体で網目状の分布が見られる。8 細胞胚では全ての割球で核の周辺に分布するが、A4.1 割球対には少ない。囊胚から尾芽胚では、予定表皮細胞に強い染色が見られる他、予定筋肉細胞でも染色が見られた。このような蛋白質の発現様式は、おそらく ER の分布を反映していると思われる。カタユレイボヤを用いた研究では、被囊形成とタイミングを合わせて表皮細胞が ER に富んでくること (Mancuso, 1973)、間充織細胞が粗面 ER に富んでいること (Katz, 1983) が示されており、今回の抗体染色の結果とよく一致する。他の動物では主に培養細胞を用いた *in vitro* の実験系が用いられており、初期発生における SEC61/Sec61 遺伝子の発現様式は報告されていない。マボヤ胚で見られたようなダイナミックな転写および翻訳調節が行われているかどうか、非常に興味深いところである。

D. 表皮細胞特異的遺伝子の自律的発現 本研究において、8 細胞期までの胚から単離された表皮系統の割球は全て表皮細胞特異的遺伝子の mRNA を発現できることがわかった。同様に、表皮系統の割球を単離した後卵割阻害したまま発生させても、全ての予定表皮細胞で特異的遺伝子を発現することがわかった。しかしながら今回の実験においては、必ずしも全ての部分胚が特異的遺伝子の発現をしたわけではなかった。このことは特に 4 細胞期に単離して卵割阻害して発生させた胚における HrEpiB 遺伝子の発現に関して顕著である(A3 で 33%、B3 で 50%が発現した; 表 3)。このように発現率が低くなった原因として、単離および卵割阻害の過程での何らかの障害を与えてしまった可能性がある。線虫 *C. elegans* の腸の分化運命決定は、最初は卵細胞質因子による自律的分化過

程と考えられていた (Laufer et al., 1980; Edgar and McGhee, 1986)。しかし最近の研究で、腸の前駆細胞 (EMS 割球) を 4 細胞期の前半に単離して育てても腸はできないが、後半に単離すると腸ができることがわかり、細胞間相互作用によることが示唆された (Goldstein, 1992, 1993)。同様の現象はマボヤの A4.1 系統の筋肉前駆細胞についても報告されている (Nishida, 1990)。今回の実験では、割球の単離は全て各細胞期の前半に行なった。単離割球に由来する部分胚では、HrEpiA と HrEpiB のどちらも 80% 以上の実験胚で発現していた。従って、4 細胞期に単離して卵割阻害して発生させた胚における HrEpiB 遺伝子の発現率の低下は、卵割阻害剤によるなんらかの障害によると考えられる。表皮細胞特異的抗体による同様の実験においても 4 細胞期には表皮細胞分化マーカーの出現率が低下するという報告がある (Nishikata et al., 1988)。

E. 表皮細胞特異的遺伝子の発現調節機構

フュージョンコンストラクトの顕微注入実験から、HrEpiB 遺伝子の -345 から +200 の領域および HrEpiD 遺伝子の -166 から +108 までの領域は、それぞれの遺伝子の胚の表皮細胞での特異的発現に関与する情報を含んでいることがわかった。また、囊胚期での転写活性化に関わる因子もこれらの領域に含まれていると考えられる。従ってこれらの領域には表皮細胞での空間的・時間的に特異的な転写活性化を担うシスエレメントが含まれていると考えられる。実際にこれら 2 つの遺伝子の転写開始点よりも上流側の領域の塩基配列を決定し、2 種類の方法で比較したところ、多くの共通の塩基配列モチーフが見つかった。両者に共通に含まれる塩基配列モチーフは、2 つの遺伝子に共通の特徴である表皮細胞での特異的発現、変態開始後の転写の継続、囊胚期の活性化に関わっていると考えられる。また、一方の遺伝子にのみ見いだされる塩基配列モチーフは、それを含む遺伝子の特異的な制御、すなわち、マターナルな転写に関わっていると考えられる。今回実験に用いなかった残る 2 タイプの遺伝子についても考え合わせると、時間的発現の異なる 4 タイプの遺伝子に関して図 26 に示したようなモデルが考えられる。このモデルはマボヤ胚の表皮細胞特異的遺伝子の転写調節機構の最も単純なものである。表皮細胞で特異的に発現し、時間的な発現様式が異なる 4 タイプの遺伝子上流域には、この図に示したようなシスエレメントが存在すると考えられる。このモデルでは、全てに共通に存在すると考えられる表皮細胞での組織特異的発現および囊胚期の転写活性化、また、それぞれに特異的な母性転写産物の蓄積および変態開始後の転写継続という 4 つの発現制御について、すべてポジティブな因子が働いていると仮定している。逆のモデルとしては、それぞれの遺伝子が発現していない場所・時期に抑制的に働く因子が存在していることが考えられる。これらは今後の研究で明らかにしていかなければならない。今後の課題は、マボヤ胚の表皮細胞における転写活性化において実際に機能している共通および非共通の塩基配列モチーフを、デリーションコンストラクトやミュータントコンストラクトを用いて確かめることである。機能しているシスエレメントがつきとめられたら、そこに結合する転写調節因子

を同定したいと考えている。そのようにして遺伝子発現制御のカスケードをさかのぼっていくことによって、卵細胞質因子に始まる表皮細胞分化過程を明らかにできると考えている。転写調節因子の単離には、その因子に富んだサンプルを大量に集める必要がある。このような研究にマボヤの胚の表皮細胞は非常に適していると考えられる。一つの理由は、分化の同調性である。もう一つは、卵割阻害1細胞胚を利用できることである。本研究において卵割阻害1細胞胚はやはり表皮細胞の分化形質のみを発現しているということが強く示唆された。もし、卵割阻害1細胞胚が表皮細胞分化過程に関して正常胚と同じ機構を用いているとすれば、先ほどのモデルに示した4つのシスエレメントのうち、表皮細胞特異的な転写活性化と囊胚期のザイゴティックな転写活性化に関わるシスエレメントに作用する特異的転写調節因子を単離できる可能性がある。今後は、卵割阻害1細胞胚の発生途上での表皮細胞特異的遺伝子の時間的発現を調べるなどして、その利用の可能性を探っていきたい。

HrEpiB 遺伝子の cDNA クローン (A10) の塩基配列は、DDBJ・EMBL・GENBANK・NCBI の DNA 塩基配列データベースにおいて、アクセッション番号 D25537 で登録されている。また、HrEpiD (HRSEC61) 遺伝子の cDNA クローン (C23) の塩基配列は、同じデータベースに、アクセッション番号 D25536 で登録されている。

謝辞

本研究を行うにあたって、研究材料であるマボヤの採集や飼育に協力して下さった東北大学浅虫臨海実験所、東京大学海洋研究所大槌研究センターの皆様にご感謝いたします。特に、大量の胚の採集のために長期にわたって実験施設を使わせて下さった浅虫臨海実験所の沼宮内隆晴助教授に深く感謝いたします。また、マボヤ卵巣由来ゲノムライブラリーを提供して下さった日下部岳広博士、抗 Sec61 抗体を提供して下さった E. Hartmann 博士、pPD1.27 ベクターを提供して下さった A. Fire 博士にご感謝いたします。

本研究は京都大学理学部動物学教室において行われましたが、常に激励と有益な議論をして下さった分子発生研究室ならびに発生研究室の皆様にご感謝いたします。特に、本研究の前半において共同研究者として数々の助言と分子生物学的手法の指導をして下さった真壁和裕博士に深く感謝いたします。同様に共同研究者として、表皮細胞の自律的分化の証明のための実験に協力して下さった万里川雄補氏ならびに吉田章子氏にご感謝いたします。万里川雄補氏はまた、顕微注入法の指導もして下さいました。深く感謝いたします。

最後に、指導教官として、また共同研究者として、本研究に対する全面的な指導と助言をして下さり、本稿に対しても精読と批評をして下さった、京都大学理学部佐藤矩行教授に心から感謝いたします。

引用文献

Araki, I., Saiga, H., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1994). Expression of AMD1, a gene for MyoD1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203, 320-327.

Arndt, E. (1992). The genes for ribosomal protein L15 and the protein equivalent to SecY in the archaeobacterium *Haloarcula (Halobacterium) marismortui*. *Biochim. Biophys. Acta* 1130, 113-116. Auer,

J., Spicker, G. and Bock, A. (1991). Presence of a gene in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii* homologous to secY of eubacteria. *Biochimie* 73, 683-688.

Beach, R. L. and Jeffery, W. R. (1992). Multiple actin genes encoding the same α -muscle isoform are expressed during ascidian development. *Dev. Biol.* 151, 55-66.

Cameron, R. A. and Davidson, E. H. (1991). Cell type specification during sea urchin development. *Trends Genet.* 7, 212-218.

Cerretti, D. P., Dean, D., Davis, G. R., Bedwell, D. M. and Nomura, M. (1983). The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 2599-2616.

Chabry, L. (1887). Contribution a l'embryologie normale et teratologique des Ascidies simples. *J. Anat. Physiol. (Paris)* 23, 167-319.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Citron, B. A. and Denelson, J. E. (1984). Sequences of the *Saccharomyces GAL* region and its transcription in vivo. *J. Bacteriol.* 158, 269-278.

Clement, A. C. (1952). Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. 1. The role of the polar lobe in determination of the cleavage pattern and its influence in later development. *J. Exp. Zool.* 121, 593-625.

Cloney, R. A. (1990). Urochordata – Ascidiacea. In "Reproductive Biology of Invertebrates" (Adiyodi, K. G. and Adiyodi, R. G., Eds.), pp. 391–451. Oxford & IBH, New Delhi.

Conklin, E. G. (1905a). Organ forming substances in the eggs of ascidians. *Biol. Bull.* 8, 205–230.

Conklin, E. G. (1905b). The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 13, 1–119.

Cowan, A. E. and McIntosh, J. R. (1985). Mapping the distribution of differentiation potential for intestine, muscle, and hypodermis during early development in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 41, 923–932.

Crowther, R. J. and Whittaker, J. R. (1986). Differentiation without cleavage: Multiple cytospecific ultrastructural expressions in individual one-celled ascidian embryos. *Dev. Biol.* 117, 114–126.

Davidson, E. H. (1986). "Gene Activity in Early Development," 3rd ed., Academic Press, Florida.

Davidson, E. H. (1989). Lineage-specific gene expression and the regulative capacities of the sea urchin embryo: a proposed mechanism. *Development* 105, 421–445.

Davidson, E. H. (1990). How embryos work: A comparative view of diverse modes of cell fate specification. *Development* 108, 365–389.

Davidson, E. H. (1994). Molecular biology of embryonic development: How far have we come in the last ten years? *BioEssays* 16, 603–615.

Douglas, S. E. (1992). A *secY* homologue is found in the plastid genome of *Cryptomonas* F. *FEBS Lett.* 298, 93–96.

Edgar, L. G. and McGhee, J. D. (1986). Embryonic expression of a gut-specific esterase in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 114, 109–118.

Edgar, L. G., Wolf, N. and Wood, W. B. (1994). Early transcription in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 120, 443–451.

- Fire, A., Harrison, S. W. and Dixon, D. (1990). A modular set of lacZ fusion vectors studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 93, 189–198.
- Ghosh, D. (1993). Status of the transcription factors database (TFD). *Nucleic Acids Res.* 21, 3117–3118. Goldstein, B. (1992). Induction of gut in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature* 357, 255–257.
- Goldstein, B. (1993). Establishment of gut fate in the E lineage of *C. elegans*: The roles of lineage-dependent mechanisms and cell interactions. *Development* 118, 1267–1277.
- Gurdon, J. B. (1992). The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68, 185–199.
- Gülich, D., Hartmann, E., Prehn, S. and Rapoport, T. A. (1992a). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357, 47–52.
- Gülich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.-U. and Rapoport, T. A. (1992b). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, 489–503. Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Gülich, D., Jetsch, S. and Rapoport, T. A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654–657.
- Hikosaka, A., Satoh, N. and Makabe, K. W. (1993). Regulated spatial expression of fusion gene constructs with the 5' upstream region of *Halocynthia roretzi* muscle actin gene in *Ciona savignyi* embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203, 104–112.
- Hikosaka, A., Kusakabe, T. and Satoh, N. (1994). Short upstream sequences associated with the muscle-specific expression of an actin gene in ascidian embryos. *Dev. Biol.* 166, in press.
- Hirano, T., Takahashi, K. and Yamashita, N. (1984). Determination of excitability types in blastomeres of the cleavage-arrested but differentiated embryos of the ascidian. *J. Physiol.* 347, 301–325.

Jäckle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G. (1992). Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J. Cell Sci.* 16 suppl., 39–51.

Jeffery, W. R. (1983). Messenger RNA localization and cytoskeletal domains in ascidian embryos. In "Time, Space and Pattern in Embryonic Development" (Jeffery, W. R. and Raff, R. A., Eds.), pp. 241–259. Alan R. Liss, New York.

Jeffery, W. R. (1989). Requirement of cell division for muscle actin expression in the primary muscle cell lineage of ascidian embryos. *Development* 105, 75–84.

Kang, S.-K., Kudo, T. and Hirokoshi, K. (1992). Molecular cloning and characterization of an alkalophilic *Bacillus* sp. C125 gene homologous to *Bacillus subtilis* secY. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1365–1370.

Katz, M. J. (1983). Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* 164, 1–27.

Koivula, T., Palva, I. and Hemilä, H. (1991). Nucleotide sequence of the secY gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four SecY proteins. *FEBS Lett.* 288, 114–118.

Kowalevsky, A. (1866). *Entwicklungsgeschichte der einfachen Asciden*. Mem. l'Acad. St. Petersburg, Ser. 7 10, 1–19. Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191–201.

Kusakabe, T., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1992). Tunicate muscle actin genes Structure and organization as a gene cluster. *J. Mol. Biol.* 227, 955–960.

Kusakabe, T., Suzuki, J., Saiga, H., Jeffery, W. R., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1991). Temporal and spatial expression of a muscle actin gene during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* 33, 227–234.

Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.

Laufer, J. S., Bazzicalupo, P. and Wood, W. B. (1980). Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 19, 569–577.

Lawrence, P. A. and Morata, G. (1994). Homeobox genes: Their functions in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78, 181–190.

Lorence, M. C., Corbin, C. J., Kamimura, N., Mahendroo, M. S. and Mason, J. I. (1990). Structural analysis of the gene encoding human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/D5 \rightarrow 4 isomerase. *Mol. Endocrinol.* 4, 1850–1855.

Makabe, K. W., Fujiwara, S., Nishida, H. and Satoh, N. (1992). Failure of muscle myosin-chain gene expression in quarter ascidian embryos developed from the secondary muscle lineage cells. *Zool. Sci.* 9, 569–573.

Makabe, K. W., Fujiwara, S., Saiga, H. and Satoh, N. (1990). Specific expression of myosin heavy chain gene in muscle lineage cells of the ascidian embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199, 307–313.

Makabe, K. W. and Satoh, N. (1989). Temporal expression of myosin heavy chain gene during ascidian embryogenesis. *Dev. Growth Differ.* 31, 71–77.

Mancuso, V. (1973). Changes in fine structure associated with test formation in the ectoderm of *Ciona intestinalis* embryo. *Acta Embryol. Exp.* 3, 247–257.

Melton, D. A. (1991). Pattern formation during animal development. *Science* 252, 234–241.

Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N. (1994a). Development of egg fragments of the ascidian *Ciona savignyi*: The cytoplasmic factors responsible for muscle differentiation are separated into a specific fragment. *Dev. Biol.* 162, 134–142.

Marikawa, Y., Yoshida, S. and Satoh, N. (1994b). Muscle determinants in the ascidian egg are inactivated by UV irradiation and the inactivation is partially rescued by injection of maternal mRNAs. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, in press.

Michalowski, C. B., Pfanzagl, B., L 喃 felhardt, W. and Bohnert, H. J. (1990). The cyanelle S10 spc ribosomal protein gene operon from *Cyanophora paradoxa*. *Mol. Gen. Genet.* 224, 222–231.

- Mita-Miyazawa, I., Nishikata, T. and Satoh, N. (1987). Cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in eggs and embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 99, 155-162.
- Miya, T., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1994). Expression of a gene for major mitochondrial protein, ADP/ATP translocase, during embryogenesis in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* 36, 39-48.
- Nakai, K., Tanaka, A., Omata, T. and Endo, T. (1992). Cloning and characterization of the *secY* gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 113-116.
- Nakamura, K., Nakamura, A., Takamatsu, H., Yoshikawa, H. and Yamane, K. (1990). Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene homologous to *E. coli* *secY*. *J. Biochem.* 107, 603-607.
- Nishida, H. (1986). Cell division pattern during gastrulation of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* 28, 191-201.
- Nishida, H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* 121, 526-541.
- Nishida, H. (1990). Determinative mechanisms in secondary muscle lineages of ascidian embryos development of muscle-specific features in isolated muscle progenitor cells. *Development* 108, 559-568.
- Nishida, H. (1991). Induction of brain and sensory pigment cells in the ascidian embryo analyzed by experiments with isolated blastomeres. *Development* 112, 389-395.
- Nishida, H. (1992a). Developmental potential for tissue differentiation of fully dissociated cells of the ascidian embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 201, 81-87.
- Nishida, H. (1992b). Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Development* 116, 521-529.
- Nishida, H. (1994). Localization of egg cytoplasm that promotes differentiation to epidermis in embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 120, 235-243.

Nishida, H. and Satoh, N. (1983). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme I. Up to the eight-cell stage. *Dev. Biol.* 99, 382–394.

Nishida, H. and Satoh, N. (1985). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme II. The 16- and 32-cell stages. *Dev. Biol.* 110, 440–454.

Nishikata, T., Mita-Miyazawa, I., Deno, T., Takahashi, K. and Satoh, N. (1987). Expression of epidermis-specific antigens during embryogenesis of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Biol.* 121, 408–416.

Nishikata, T., Mita-Miyazawa, I. and Satoh, N. (1988). Differentiation expression in blastomeres of cleavage-arrested embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* 30, 371–381.

Nishikata, T. and Satoh, N. (1990). Specification of notochord cells in the ascidian embryo analysed with a specific monoclonal antibody. *Cell Diff. Dev.* 30, 43–53.

O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. and O'Farrell, P. H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133–1142.

Ohama, T., Muto, A. and Osawa, S. (1989). Spectinomycin operon of *Micrococcus luteus*: Evolutionary implications of organization and novel codon usage. *J. Mol. Evol.* 29, 381–395.

Ohkubo, S., Muto, A., Kawauchi, Y., Yamao, F. and Osawa, S. (1987). The ribosomal protein gene cluster of *Mycoplasma capricolum*. *Mol. Gen. Genet.* 210, 314–322.

Okamura, Y., Ono, F., Okagaki, R., Chong, J. A. and Mandel, G. (1994). Neural expression of a sodium channel gene requires cell-specific interactions. *Neuron*, in press.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444–2448.

Reverberi, G. and Minganti, A. (1946). Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine sperimentale sull'uovo di *Ascidella aspersa* e di *Ascidia malaca* allo stadio di 8 blastomeri. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli* 20, 199–252.

Reverberi, G. and Minganti, A. (1947). La distribuzione delle potenze nel germe di Ascidie allo stadio di otto blastomeri, analizzata mediante le combinazioni e i trapianti di blastomeri. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli* 21, 1–35.

Reverberi, G., Ortolani, G. and Farinella-Ferruzza, N. (1960). The causal formation of the brain in the ascidian larva. *Acta Embryol. Morphol. Exp.* 3, 296–336.

Rose, S. M. (1939). Embryonic induction in the *Ascidia*. *Biol. Bull.* 76, 216–232. Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual," 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.

Sargent, T. D. (1989). *Xenopus*. In "Genes and Embryos" (Glover, D. M. and Hames, D. B., Eds.), pp. 127–163. IRL Press, Oxford. Satoh, N. (1978). Cellular morphology and architecture during early morphogenesis of the ascidian egg: An SEM study. *Biol. Bull.* 155, 608–614.

Satoh, N. (1982). Timing mechanisms in early development. *Differentiation* 22, 156–163.

Satoh, N. (1984). Cell division cycles as the basis for timing mechanisms in early embryonic development of animals. In "Cell Cycle Clocks" (Edmunds, L. N., Jr., Ed.), pp. 527–538. Dekker, New York.

Satoh, N. (1994). "Developmental Biology of Ascidiaceans," Cambridge University Press, New York.

Satoh, N., Nishikata, T. and Makabe, K. W. (1990). Egg cytoplasmic components responsible for larval muscle cell differentiation of ascidian embryos. In *Developmental*

Biology (Davidson, E. H., Ruderman, J. V. and Posakony, J. W. ,Eds.), pp. 143–151. Wiley–Liss, New York.

Scaramuzzi, C. D., Stokes, H. W. and Hiller, R. G. (1992). Characterization of a chloroplast–encoded *secY* homologue and *atpH* from a chromophytic alga: Evidence for a novel chloroplast genome organization. *FEBS Lett.* 304, 119–123.

Stirling, C. J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. and Schekman, R. (1992). Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 3, 129–142.

Tomlinson, C. R., Bates, W. R. and Jeffery, W. R. (1987a). Development of a muscle actin specified by maternal and zygotic mRNA in ascidian embryos. *Dev. Biol.* 123, 470–482.

Tomlinson, C. R., Beach, R. L. and Jeffery, W. R. (1987b). Differential expression of a muscle actin gene in muscle cell lineages of ascidian embryos. *Development* 101, 751–765.

Tschauder, S., Driessen, A. J. M. and Freudl, R. (1992). Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: Comparative analysis of nine members of the *SecY* family. *Mol. Gen. Genet.* 235, 147–152.

Ueki, T., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1991). Isolation of cDNA clones for epidermis–specific genes of the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* 33, 579–586.

Ueki, T., Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N. (1994). Autonomy of expression of epidermis–specific genes in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* 164, 207–218.

Ueki, T. and Satoh, N. (1994). An ascidian homolog of *SEC61* is expressed predominantly in epidermal cells of the embryo. *Dev. Biol.* 165, 185–192.

Venuti, J. M. and Jeffery, W. R. (1989). Cell lineage and determination of cell fate in ascidian embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 197–212.

Whittaker, J. R. (1973a). Segregation during ascidian embryogenesis of egg cytoplasmic information for tissue-specific enzyme development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2096–2100.

Whittaker, J. R. (1973b). Tyrosinase in the presumptive pigment cells of the ascidian embryos: tyrosinase accessibility may initiate melanin synthesis. *Dev. Biol.* 30, 441–454.

Whittaker, J. R. (1977). Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. *J. Exp. Zool.* 202, 139–154. Whittaker, J. R. (1980). Acetylcholinesterase development in extra cells caused by changing the distribution of myoplasm in ascidian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 55, 343–354.

Whittaker, J. R., Ortolani, G. and Farinella-Ferruzza, N. (1977). Autonomy of acetylcholinesterase differentiation in muscle lineage cells of ascidian embryos. *Dev. Biol.* 55, 196–200.

Wilson, E. B. (1925). "The Cell in Development and Heredity," 3rd ed. Macmillan, New York.

Yasuo, H. and Satoh, N. (1993). Function of vertebrate T gene. *Nature* 364, 582–583.

Yasuo, H. and Satoh, N. (1994). An ascidian homolog of the mouse Brachyury (T) gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Dev. Growth Differ.* 36, 9–18.

Zeschnigk, M., von Wilcken-Bergmann, B. and Starzinski-Powitz, A. (1990). cDNA from rat cells with reconstitutive galactose-epimerase activity in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 18, 5289.

Zhao, H.-F., Rh 斬 ume, E., Trudel, C., Couet, J., Labrie, F. and Simard, J. (1990). Structure and sexual dimorphic expression of a liver-specific rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *Endocrinology* 127, 3237–3239.

Zhao, H.-F., Simard, J., Labrie, C., Breton, N., Rh 斬 ume, E., Luu-The, V. and Labrie, F. (1989). Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid

sequence of bovine 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/D5-D4 isomerase.
FEBS Lett. 259, 153-157.

図と表

表 1. マボヤ *Halocynthia roretzi* の胚および幼生において表皮細胞で特異的に発現する 8 つの遺伝子の cDNA の長さと同時的発現様式のまとめ

cDNA clone	Size (kb)	Gene	Type	transcripts									
				F	8	64	G	N	T	L	J1	J5	
c1	1.2	HrEpiB	2	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++
c2	1.9	HrEpiC	3	+	+	+	+	++	++	++	++	++	-
c3	2.3	HrEpiD	4	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
c4	2.3, 3.0		1	-	-	+/-	+	++	++	x	x	x	x
c5	3.0	HrEpiA	1	-	-	-	+	++	++	+	+	-	-
c6	2.9, 3.1		2	-	-	+/-	+	++	++	x	x	x	x
c7	4.8, 10.0		1	-	-	-	-	+	+	x	x	x	x
c8	1.1, 1.5		2	-	-	+	++	++	++	x	x	x	x

x...not determined