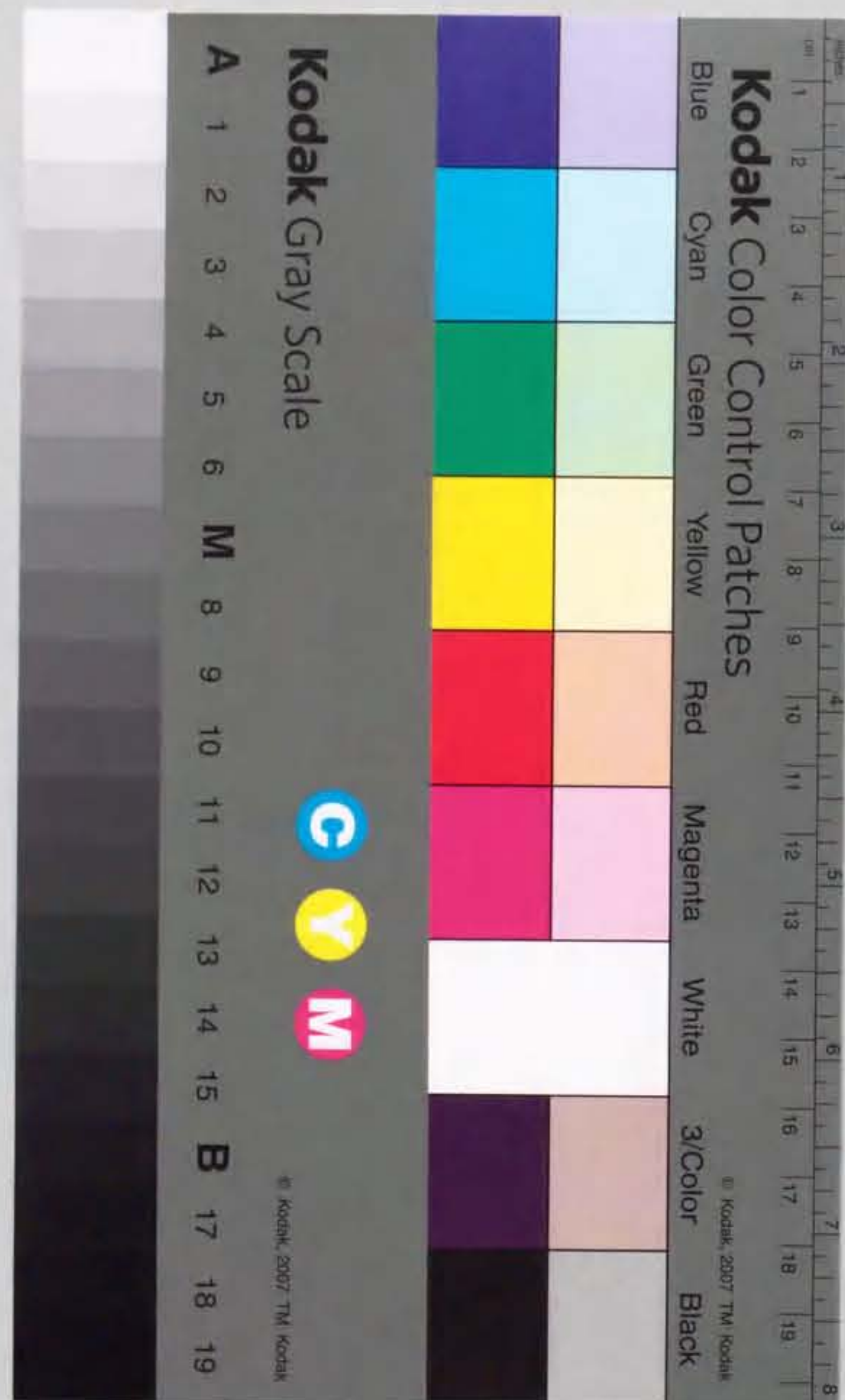


発生過程における N - m y c 遺伝子の
発現とその機能の解析

若 松 義 雄



〈論文目録〉

主論文；「発生過程における N - m y c 遺伝子の発現とその役割」

副論文 1 ； " Organization and expression of the chicken N-myc gene. "

Shoji Sawai, Kazuto Kato, Yoshio Wakamatsu and Hisato Kondoh.

Molecellar and Cellular Biology, 10, 2017-2026. (1990).

副論文 2 ； " Conditions for detection of embryonic N-myc expression

by *in situ* hybridization. "

Yoshio Wakamatsu and Hisato Kondoh.

Acta Histochemica Cytochemica, 23, 367-374. (1990)

副論文 3 ； " Tissue Distribution of N-myc expression in the early

organogenesis period of the mouse embryo. "

Kazuto Kato, Akira Kanamori, Yoshio Wakamatsu, Shoji Sawai

and Hisato Kondoh.

Development, Growth and Differentiation, 33, 29-36. (1991).

参考論文；「 *i n s i t u* ハイブリッド形成法」

若松義雄、1992年、新生化学実験講座 14巻

発生・分化・老化、400-412.

①

学位申請論文

発生過程における N - m y c 遺伝子の 発現とその機能の解析

名古屋大学理学研究科分子生物学専攻

若 松 義 雄

目次

要約	-----	1
序章	-----	3
第1章	ニワトリ N-m y c タンパク質に対する特異抗体の作成	
序	-----	9
結果	-----	9
考察	-----	11
第2章	ニワトリ発生過程における N-m y c タンパク質の発現の特異性	
序	-----	13
結果	-----	14
考察	-----	20
第3章	神経細胞の分化過程における N-m y c タンパク質の細胞内局在 の変化	
序	-----	24
結果	-----	24
考察	-----	27
第4章	肢芽の形態形成と N-m y c 遺伝子の発現調節	
序	-----	31
結果	-----	32
考察	-----	34
第5章	標的遺伝子組換えによって N-m y c 遺伝子を失ったマウス胚の 表現型の解析	
序	-----	37
結果	-----	37
考察	-----	40
終章	-----	43
材料と方法	-----	45
図表	-----	54
謝辞	-----	112
引用文献	-----	113

〈要約〉

正常な発生は、数多くの遺伝子が相互に作用しながら、時間的、空間的な特異性を持って発現されることで実現されると考えられている。本論文では、胚発生に関わる遺伝子の相互作用の中でも重要な位置を占めると考えられ、また転写調節活性が示唆されている *N-myc* 遺伝子に焦点を絞り、その発現をニワトリの発生過程を追って調べた。

遺伝子の発現分布を胚発生のステージを追って調べる研究の主流は、これまで *in situ* ハイブリダイゼーションによって mRNA を検出するものであった。しかし、mRNA の存在や量がタンパク質の存在や量に 1 対 1 で対応するものではなく、また *N-myc* がタンパク質として機能する以上、タンパク質を追跡することに大きな意義がある。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーションと、新たに作成した抗 *N-myc* 抗体を用いた免疫染色を併用して解析を行うことにより、さらに確かな解析が可能になった。またこのことにより、*N-myc* タンパク質の細胞内の局在状態に関する通説を否定する発見がなされることとなった。

N-myc の発現は発生の初期（外、内、中胚葉に分かれた直後）には全ての細胞にみられること、そしてその後、細胞集団が組織化され、器官形成が始まる時期になると、*N-myc* を発現する領域が限定されてくることが明らかにされた。さらに、一度 *N-myc* の発現が無くなった組織（中枢神経系など）でも、細胞分化にともなって *N-myc* が再び発現される場合があることも解った。胚発生にともなう *N-myc* の発現の変遷は、基本的にマウスでも同じであった。

N-myc を発現する細胞集団（組織）の分布について詳しい解析がなされた。中枢神経系では、既に分裂を終えた神経細胞で *N-myc* の高い発現が見られた。*myc* ファミリー遺伝子は細胞の増殖を制御していると考えられてき

たが、N-mycの発現と細胞増殖が関連していないことが示された。また、皮質層に位置した神経に加えて、神経上皮層から皮質層に移動中の神経芽細胞と思われる細胞でもN-mycの発現がみられた。このことから、N-myc遺伝子は中枢神経系では皮質層の形成に関与しているものと考えられた。

器官形成途中の肺や消化管では、N-mycを発現している細胞集団は上皮と接している間充織部分に多くみられた。これらの内臓器管の形成には上皮と間充織の組織間相互作用が必要であることが知られている。よって、N-myc遺伝子は組織間の相互作用に関与しているものと推測された。

N-myc遺伝子を標的遺伝子組換えによって破壊したマウス胚の表現型についても組織学的に解析した。その結果、正常胚ならばN-mycが発現している器官で異常が認められた。例えば中枢神経系では、皮質層の厚さが薄くなっていた。また消化管のうちでも、胃が形成されず、肺では気管支が形成されなかった。これらの結果は、中枢神経系での皮質構造の形成や、消化管などにおける組織間相互作用といった、N-mycの胚発生への関与のしかたについての先の推測を支持するものであった。

Mycファミリーのタンパク質はこれまで、常に核にあるものと考えられてきた。しかし、N-mycタンパク質の組織内、細胞内での分布を調べると、小脳のプルキンエ細胞や網膜の神経節細胞、脊髄神経節の感覚神経細胞などのいくつかの大きな細胞体を持った神経細胞では、N-mycタンパク質が細胞質に蓄積されることを見いだした。Mycファミリータンパク質は、Maxタンパク質と複合体を形成して核に移行し、転写制御などに機能すると考えられている。細胞質にあるN-mycタンパク質は、Maxタンパク質などとの相互作用を通して他のmycファミリータンパク質の活性を調節をしているというモデルが示された。

序 章

(1) 発生と遺伝子

多細胞生物は、最初受精卵という名の一個の細胞から始まり、分裂を繰り返して細胞数を増やしながら、一個体を形成していく。この発生という過程において、正しく生物の形が作られるためには、秩序だった細胞の分裂と共に、規則正しい細胞の移動や配置、特定の個性を持つ細胞への分化が行われなければならない。これを可能にしているのは、細胞種特異的な遺伝子の発現であり、さらにそれを制御している上位の遺伝子群であると考えられる。従って、こういった遺伝子発現調節の機構をひも解いていくことが、発生という複雑で、しかしそれ故に魅力的な現象を理解する上で、不可欠であるといえるだろう。

発生過程における遺伝子発現の調節機構を調べていくアプローチの一つとして、細胞種特異的に発現する遺伝子群から始めるやり方がある。例えば、肝細胞ならアルブミン、水晶体ならクリスタリンといった、その細胞種を特徴づけるような遺伝子たちが、どの様な発現調節を受けているのかを調べ、カスケードを遡って行くのである。この方法で、これまでに多くの遺伝子について、その特異的発現の為に必要なプロモーター領域や、エンハンサー、サイレンサーが同定されている。そして、そこに相互作用して働く転写調節因子が見いだされており、多くの成果が得られている。

その一方で、カスケードのより上流に位置する（と思われる）遺伝子から始める方法もある。他の遺伝子の発現調節を行うと考えられる遺伝子が、具体的にどの遺伝子をターゲットとしており、それを通じてどの様な現象に関わって行くのかを調べる。そしてその調節因子自身がどの様な制御の下にあるのかを解析していくことでカスケードの上流、下流を明らかにして行くのである。例

例えば、形態形成因子と考えられているホメオボックス遺伝子群については、ターゲット遺伝子の同定の努力がなされており (Gould et al. 1990 など)、またホメオボックス遺伝子自身の部位特異的な発現についても研究が進められている (Whiting et al. など)。今回私が取り上げる *N-myc* 遺伝子もこちらの例に当てはまる。

(2) 細胞性癌遺伝子と *myc* 遺伝子ファミリー

今日までに、レトロウイルスの癌遺伝子 (*v-onc*) は 20 種類以上も見つかり、その起源は正常細胞の持つ遺伝子 (*c-onc*) に由来する。*c-onc* は、脊椎動物を中心に広く保存されており、その適切な発現は個体の生存に必須である。その生体内での働きについてはまだ全てが明らかになったわけではない。しかし、例えば *src* 遺伝子はタンパク質のリン酸化活性を持ち、細胞質や細胞膜に存在するし、*ras* 遺伝子は細胞膜に局在して *GTPase* 活性を持つことが示されている。また、*myc* 遺伝子ファミリーは核に局在して *DNA* に結合することがわかっており、これら *c-onc* はシグナルの伝達、遺伝子発現の調節に直接的もしくは間接的に関わっていると考えられる。それ故、*c-onc* の中でも正常では発生期に発現する遺伝子は、細胞の分化に関与している可能性が大きいと考えられた (for review, Bishop. 1983, Varmus. 1984, Adamson. 1987)。

これまでに、*myc* 遺伝子ファミリーについては *c-myc* 以外にも、比較的によく研究されているものとして *N-myc*、*L-myc* がある。これらのうち、*N-myc* 遺伝子は幾つかの神経芽腫細胞で増幅されていることから見い出され、*c-myc* 遺伝子との相同性から単離されたものである (Kohl et al. 1983, Schwab et al. 1983)。これはヒトの遺伝子であったが、その後マウス (DePinho et al. 1986)、ニワトリ (これは我々のグループによる。)(Sawai et al. 1990)、カナリア (Collum et al. 1991)、アフリカツメガエル

(Vize et al. 1990) で取られている。myc 遺伝子ファミリーは、アミノ酸配列や遺伝子構造の点で共通の特徴を持っている。例えば、3つのエクソンから成り、タンパク質をコードしている領域が2番目と3番目のエクソンに存在している(図6-1)ことや、DNA結合やホモ、ヘテロ二量体を形成するモチーフを持っていることなどが挙げられる(図1-1)。また、抗体を使った研究などから、そのタンパク質が核内に局在することも示されており(Ikegaki et al. 1986, Slamon et al. 1986, Ueno et al. 1988)、トランスに働く転写調節因子であると考えられている。しかし、N-myc が正常発生においてどのような現象に関与しているのかという点については、まだ全くと言っていいほど解っていない。ただ、初期発生期に強く発現し、成体ではほとんど発現していないこと(Jacobovitz et al. 1985, Depinho et al. 1986)や腎臓などの器官形成過程で発現すること(Mugrauer et al. 1988, Downs et al. 1989, Hirning et al. 1991, Kato et al. 1991, Mugrauer and Ekblom. 1991)などが既に示されており、組織分化において重要な働きをしていると考えられている。私は発生過程でのN-mycの役割を調べるために、発生学的知見が豊富で、胚操作の点で優れた実験系が幾つもあるニワトリを主な材料に用いて研究を進めてきた。これまでに遺伝子の単離、構造の解析などからほ乳類のN-mycと良く似ていることがわかっている。また、3.5日胚においてmRNAが中枢神経系や中胚葉性の組織、神経冠由来の組織などに組織特異的に分布していることも示している(Sawai et al. 1990)。

(3) N-myc 遺伝子の構造と機能

N-myc 遺伝子の生体内での役割は解っていないけれども、遺伝子の塩基配列やアミノ酸の配列からいろいろのことが推測され、実験的にも多くの機能領域が明らかになっている。

N-myc 遺伝子から転写されるmRNAについては幾つかの機能領域があ

ると推測される。タンパク質をコードしていない領域については、エクソン1を含む5'側は生物種間で塩基配列が保存されていないことから、特別重要な機能を持たないと考えて良いだろう (Sawai et al. 1990)。一方、エクソン3にある非コード領域は極めてアデニン、ウラシル残基に富んでおり、生物種間で保存されている (Sawai et al. 1990)。このような例はショウジョウバエの *hunchback* や *bicoid* でよく研究されており、ポリA末端長の可逆的な調節による翻訳効率の制御に働いていることが解っている (Wharton and Struhl, 1991など)。したがって、N-mycについても同様な機能が有るのかも知れない。またコード領域については、N-myc や c-myc で mRNA の安定性に関与する領域が3'側に存在することが報告されている (Bernstein et al. 1992, Nagashima, personal communication)。

N-myc 遺伝子から推測されるタンパク質産物は、生物種間、myc 遺伝子ファミリー間での保存度から、幾つかの機能領域が推定されている。アミノ末端側には、myc ボックスと呼ばれる、c-myc、N-myc、L-myc で保存されている配列が幾つか存在している。その機能については明かでないが、c-myc タンパク質では、myc ボックスの幾つかがカゼインカイネースII等によるリン酸化を受けることが示されており (Lüscher et al. 1989)、N-myc を含むmyc ファミリーのタンパク質産物は、リン酸化による活性調節を受けていると考えられる。

カルボキシル末端側には、myc ファミリー全てに共通のモチーフが存在している (図1-1)。塩基性アミノ酸に富んだ領域から、ヘリックスループヘリックス、ロイシンジッパーと続くこの構造 (B-H L H-L Z i p) は、塩基性領域がDNA結合、H L H、L Z i p が共に2量体形成に働くことが多くの転写調節因子で知られている (for review, Lüscher and Eisenman, 1990)。B-H L Hを持つものとしては、E12、E47 や *daughterless* など、B-L Z i p をもつものとしてはFos、Junなどがよく知られている。さらに、

m y c 遺伝子ファミリー以外で両方のモチーフを持つものとして、U S F や A P 4 などが報告されている。こういった遺伝子のタンパク質産物は、2 量体（しばしば、E 1 2 - E 4 7 や F o s - J u n などのヘテロ 2 量体）を形成して、塩基配列特異的に D N A 結合する事で転写調節に参加している。

m y c 遺伝子群も同様に、2 量体形成後、D N A に結合して転写調節を行うものと考えられた。近年、M a x 遺伝子（これはヒトの遺伝子で、マウスホモログは M y n と呼ばれる）が、c - m y c タンパク質と結合するタンパク質をコード遺伝子として単離された（Blackwood and Eizenman, 1991, Prendergast et al. 1991）。c - m y c は、ホモ 2 量体でも C A C G T G という塩基配列を認識して弱く結合する（Blackwell et al. 1990）。しかし、M a x とヘテロ 2 量体を作るとより強いアフィニティーを示すようになることから、生体内では主にヘテロ 2 量体の形で機能することが考えられている。したがって、N - m y c 遺伝子についても同様な働き方が考えられ、M a x と 2 量体を形成することが報告されている（Blackwood and Eizenman, 1991, Wenzel et al. 1991）が、N - m y c が発生過程で実際にどんなタンパク質と 2 量体を形成しているのかは明かでない。

これまでに述べたような、アミノ末端側の領域と、カルボキシル末端側のモチーフとの間の部分にも重要な配列があると考えられる。領域 VIII と呼んでいるこの部分は、c - m y c と N - m y c の間では相同性が低いが、N - m y c と L - m y c、M a x（M a x では最もカルボキシル末端側に位置しているが）に、特徴的なアミノ酸配列が保存されている（Wakamatsu, unpubrished observation）。c - m y c ではこの領域が、タンパク質の核への移行シグナルとして機能する（Dang and Lee, 1988）。また、M a x について、 Δ M a x と呼ばれる短いフォームがあることが報告されているが、この配列を失っている（Mäkelä et al. 1992）。さらに、U e n o らは N - m y c についてはこの部分がなくても核に移行することが報告している（Ueno et al. 1988）。詳細は後述

するが、今回の研究で、c-mycタンパク質は核へ移行するが、N-mycタンパク質は細胞質に留まる細胞種があることが見いだされた。このようなことから、領域Ⅷが核移行の調節に機能している可能性が考えられる。

私はここまでに述べたような知見を基に、N-mycが発生について具体的にどのような役割を担っているのかを解析していきたいと考えている。そのために、実験動物としてはニワトリを中心とし、マウスも用いている。この2種類の動物は、それぞれに異なる長所を備えている。ニワトリは先に述べたように、発生学に古くから用いられてきたことで知見が数多くある。また、卵の中で発生するため、胚に実験操作を施しやすいなどの利点もある。一方マウスは、近年トランスジェニック技術の発達や胚性幹細胞を用いた実験系が進んで来ており、それぞれの長所を生かした解析を行って行こうとしている。そのために私は、ニワトリについてはN-myc遺伝子の発現の時間的、空間的特異性を調べ、また胚操作を行ってN-mycの発現の変化について調べた。マウスについては主に、人為的にN-myc遺伝子を破壊した胚の表現型について解析した。

第一章

ニワトリ N-my c タンパク質に対する特異抗体の作成

序

これまでの N-my c の発現に関する報告の多くは、mRNA について見たものだった。特に組織切片上での解析では、ほとんど全てが *in situ* ハイブリダイゼーションによるものであった。その一つの理由は、N-my c 遺伝子が my c 遺伝子ファミリーの一つであり、互いに似ているため、十分な特異性を持った抗体が出来難いことが挙げられる。しかし、翻訳時の調節や、N-my c タンパク質の修飾などの可能性等について考えると、やはり特異抗体を作成しておく事は重要であると思われた。そこで、タンパク質レベルで解析が行えるように、ニワトリ N-my c タンパク質を特異的に認識する抗体を調製する事とした。

結果

(1) N-my c 特異的抗血清の調製

N-my c 遺伝子は、my c 遺伝子ファミリーに属しており、特異抗体の作成に当たっては c-my c タンパク質などとの交差反応の無いものを得る必要があった。そこで、塩基配列から予想されるアミノ酸配列を基に、N-my c タンパク質に特異的な配列を2種類選び出し、ポリペプチドを合成した。選んだ場所は、エクソン3の領域Ⅷと呼ばれる部分の32アミノ酸と、カルボキシ

ル末端の12アミノ酸である(図1-1)。これらの合成ポリペプチドをハプテンのヘモシアニンに結合させて、それぞれをウサギに免疫して抗血清を得た。なお、32アミノ酸を抗原にして作成した抗血清を抗CN32抗血清、12アミノ酸を抗原にした方を抗CN12抗血清と名付けた。

(2) 抗N-myc抗体の精製と特異性の検索

調製した抗血清がN-mycタンパク質を認識できるかを調べるために、大腸菌に作らせたN-mycタンパク質についてウェスタンブロッティングを行った。N-myc遺伝子からエクソン3のコーディング領域(図1-1)を切り出し、発現ベクターのpET3aにクローン化した。この遺伝子は大腸菌に形質転換し、発現を誘導した後にSDS-PAGEを行った。そしてウェスタンブロッティングを行ったところ、抗CN12抗血清、抗CN32抗血清ともアミノ酸配列から予想される約22kDa(図1-2A)の大きさの所にバンドが見られた。ただし、同量のタンパク質を電気泳動したのにも関わらず、抗CN12を用いた場合の方がバンドが薄いことから、こちらの方がやや抗体価が低いと考えられた。

この抗血清を用いて組織切片を染色するとバックグラウンドがかなり高かったため、抗CN32抗血清については抗原カラムを作成してアフィニティークロマトグラフによって抗体を精製した。そしてこの精製した抗体(以後抗32抗体と呼ぶ)が、真核細胞で発現したN-mycタンパク質と特異的に反応する事を調べた。N-myc遺伝子をサイトメガロウイルスのプロモーターにつないで(pCDM8-c23)、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(pMiwZ)と共にESTO細胞株にトランスフェクションした。そしてDAPI、抗CN32抗体、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体を用いて間接蛍光抗体法による三重染色を行ったところ、 β -ガラクトシダーゼを発現している細胞(即ち遺伝子の導入された細胞)の核のみが抗CN32抗体によって染色された(図1-2B)。

次に組織切片中でN-mycタンパク質を検出できる事を調べた。N-myc遺伝子の発現が良く調べられているニワトリ3.5日胚について間接蛍光抗体法による免疫染色を行った。その結果、染色の分布は*in situ*ハイブリダイゼーションによるmRNAの分布(図1-3A)と良く一致して肢芽や脊髄などが染まっており、しかも細胞の核が染色されていた(図1-3B、C、E、F)。またこの染色は、抗体を予め抗原によって吸収しておくで消失する事から(図1-3D)、N-mycタンパク質を特異的に検出しているものであると考えられた。その一方で赤血球が非常に強く染色されたが(図1-3B、E、G)、特に目立ったmRNAの発現はみられていない事から、N-mycタンパク質とは別のものと交差していると考えられた。さらに、内胚葉性上皮組織の細胞質も染色されたが、これは抗原による吸収によっても無くならないので、抗体の反応に因らない非特異的な染色であると考えられた(図1-3G、H)。また、CN12による染色では赤血球や内胚葉性上皮の染色がみられなかった事は上に述べた考えを指示していると思われた。

考察

大腸菌によって作られたN-mycタンパク質を検出できた事、N-myc遺伝子を導入した細胞が選択的に染色された事などから、今回得られた抗体はN-mycタンパク質に強く反応するものであると考えられた。また、組織切片の免疫染色の結果から、赤血球や消化管上皮などに若干の非特異的な結合はみられたものの、コントロールとの比較や、CN12とCN32という2つの異なるエピトープを持つ抗体間での対比によって、充分解析に使用出来る事が示された。さらに、c-mycタンパク質に対する抗体染色についてはJaffredoらが既に報告しているが(Jaffredo et al. 1989)、次章でも述べ

るように、染色される部分が異なるので、今回作成した抗体がc-mycタンパク質と交差反応している可能性は低いものと考えられた。

第 2 章

ニワトリの発生過程における N - m y c タンパク質の発現の特異性

序

機能的に未知のある遺伝子があったときに、その発現の特異性を解析することは色々な点で有用である。例えば、発現の組織特異性や時期特異性から、その遺伝子の関与するイベントについて推測することができる。また、その遺伝子と他の遺伝子の関わり合い（どのような遺伝子によって調節を受け、どのような遺伝子を調節しているか、等）を知る手がかりとなる。さらに、近年盛んになっている遺伝子操作による解析の際には、特に重要な情報となるだろう。こういった観点から、これまでに数多くの遺伝子発現パターンが報告されている。

N - m y c 遺伝子もまた、発生過程での役割が明かでない遺伝子であり、その発現パターンについてはいくつかの報告がなされている。例えばマウスでは、D o w n s らが 6. 5 ~ 8. 5 日胚について (Downs et al. 1989)、我々が器官形成期に当たる 9. 5 日胚について N - m y c の発現を報告している (Kato et al. 1991)。また、M a g r a u e r らは、発生後期から誕生直後の脳や特に腎臓での発現を調べている (Magrauer et al. 1988, Mugaueer and Ekblom. 1991)。最近では Y a m a d a らが、口腔の器官形成時の発現を報告している (Yamada et al. 1992)。哺乳類についてはあと、ヒトで少し報告がある (Ii rvonen et al. 1989)。それ以外の生物種では、我々がニワトリ 3. 5 日胚で (Sawai et al. 1990)、V i z e らがアフリカツメガエルの初期発生での発現を調べている (Vize et al. 1990)。

しかし上に述べた何れの報告も断片的であり、1つの研究グループで発生過程を追って調べたものはない。また、ほとんどが*in situ*ハイブリダイゼーション法によってmRNAの分布を調べている(我々の報告しているマウス9.5日胚、Vize等のアフリカツメガエルでの解析は抗体を用いたデータを含んでいる。)。 *in situ*ハイブリダイゼーションでは、細胞単位の解析が困難である上、転写後の調節の可能性について知ることが出来ないといった難点を含んでいる。またマウスではそれでもかなり情報が多いのであるが、我々の研究対象としているニワトリとは発生 of 進行の仕方が異なっている部分も多々あり、N-mycの発現パターンが同じであるという保証もない。以上の問題点を解決するためにも、*in situ*ハイブリダイゼーションと免疫染色を併用し、ニワトリの発生過程を追ってN-myc遺伝子の発現を調べることにした。また、N-myc遺伝子の発現パターンとビンキュリン遺伝子の発現分布がかなり似ているようであったので(Duband and Thiery, 1990)、両者の比較についても併せて調べた。なお発生Stageの特定は、Humburger & Hamiltonの発生段階表(Hunburger and Hamilton, 1951)に拠っている(図6-2)。

結果

(1) 発生初期(神経胚初期)における発現

1体節期(stage 7)胚でのN-mycタンパク質の分布を間接蛍光抗体法を用いて調べた。その結果、表皮外胚葉、神経上皮、始原中胚葉、体節、内胚葉、のいずれにおいても、抗N-myc抗体による染色の強さに違いはなかった。また、DAPIによる核染色との比較からもわかるように、全ての核がはっきりと染まっていた。それは、頭部領域、体節部、原条領域のいずれに

においても同様であった（図 2 - 1）。

（ 2 ） 中 枢 神 経 系 での 発 現 ； 脊 髄

神経板形成期以降 2. 5 日胚頃までは、神経管は未分化な神経上皮細胞によって占められており、それと対応するように N - m y c の発現もまた均一であった。しかし、3 ～ 3. 5 日胚以降、腹側より始まる脊髄内での神経の細胞分化と層構造の形成に伴い、N - m y c の発現も局在化を示すようになる（図 2 - 2 A）。S t a g e 2 1 では抗 C N 3 2 染色は主に脊髄背部の一部の細胞に見られ（図 2 - 2 C）、m R N A の分布とも一致した。加えて、前角の形成開始と対応して、N - m y c を発現する細胞が前角辺縁層にも認められた。前角の N - m y c を発現している細胞が抗ニューロフィラメントによっても染色される事から、これらの細胞が運動神経に分化してきている事が解った。そして、この背側の発現領域と前角部分の間には、神経細胞層に移動中と考えられる少数の細胞も染色された（図 2 - 2 C）。更に発生が進んで S t a g e 2 9 になると抗 C N 3 2 抗体によって染色される細胞は、前角のニューロフィラメント陽性の運動神経に限られるようになった。S t a g e 3 1 ではこの前角での N - m y c の発現は消失して、神経上皮で発現がみられた。この部分は未分化な神経上皮細胞と、上皮細胞と呼ばれるある種のグリア細胞から成っている。分化した神経細胞では発現はみられず、神経上皮層に接近した部分の一部の細胞が弱く染色されたのみであった。これ以降、N - m y c の脊髄での発現は急速に減少していく。

（ 3 ） 中 枢 神 経 系 での 発 現 ； 大 脳

脳での N - m y c の発現は、2 日胚頃までは脊髄での発現と同様に均一であった。しかし、その後の複雑な形態形成の過程で、N - m y c の発現もまた複雑になっていく。その中で特に興味深いのは、大脳の層構造の形成過程におけ

る発現領域の変化である（図2-3）。Stage 21では、おそらく大脳は全体が未分化な神経上皮細胞からなっており、それと対応するようにN-mycの発現にも層構造はみられなかった。しかし、Stage 26からStage 29、31にかけて皮質形成が進んでくると、N-mycの発現は神経上皮層では弱まり、より神経に分化した細胞からなる皮質層での発現が目立つようになる。その一方で、神経上皮層でも数としては少ないものの、強くN-mycを発現している細胞が認められた。おそらくこの細胞は、増殖を終えて最終的な分化の過程に入り、皮質層へ移動中の神経芽細胞ではないかと推測される。ステージ38から42では、皮質層の形成と共に細胞の分化も進んでくる。この皮質層においては、丸くてDAPIによる染色の薄い神経であると思われる細胞でのみN-mycの強い発現がみられ、それ以外のある種のグリアと思われる細胞ではN-mycの発現はみられなかった。またこの時期から、神経上皮層の細胞でやや強いN-mycの発現が認められたが、脳室から外側へ向けて突起を伸ばしており、抗GFAP抗体でも染色されることから、分化した上衣細胞であると思われた。この上衣細胞での発現は、Stage 38から42にかけて徐々に強くなっていた。

（4）中枢神経系での発現；小脳

ステージ36では、小脳葉の形成はほとんど起こっていない。しかし層構造の形成は進んでおり、N-mycの発現は、内顆粒層と、小脳核でみられた。ただしN-mycタンパク質の細胞内での局在は異なっており、内顆粒層の細胞（顆粒細胞やプルキンエ細胞の前駆細胞）では核が染色されるのに対し、小脳核の神経細胞では細胞質が染色された。この内顆粒層、小脳核での発現は調べた範囲では、その後ステージ42まで続く。ステージ38以降では、顆粒細胞の前駆細胞で構成される外顆粒層のうち、特に発達中の小脳葉先端部表層でN-mycの発現がみられた（図2-4）。これらのN-mycタンパク質を

核に持っている細胞は、外顆粒層のなかで最も分化の進んでいない細胞の集団である。

またこの時期から、大きな細胞体と特徴的な樹状突起から判別できるプルキンエ細胞が内、外顆粒層の間に現れてくる。まだ成熟の進んでいない小脳葉先端では細胞質と核の両方が染まっていた（図2-4F）。より基部側のプルキンエ細胞では細胞質側に染色が見られ（図3-6）、その細胞質の染色は同じ小脳葉の中でも基部側に位置するものほど濃く、プルキンエ細胞の成熟と共にN-mycタンパク質を多く含むようになることを示していると考えられた。ステージ40以降外顆粒層での発現は、N-myc陽性の細胞数に増減はあるものの少なくともステージ42まで続いていた。また調べた範囲では、白質部分ではN-mycの発現は認められなかった。即ち、オリゴデンドロサイトはN-mycの発現を発現していなかった。

（5）中枢神経系での発現；網膜

Stage 13の眼胞では、N-mycは均一に発現していた。しかし、Stage 19になると、色素性網膜ではまだ色素顆粒の沈着がないのだが既にN-mycの発現が減少していた。Stage 19までは神経性網膜での発現は均一であったが、それ以降網膜の層分化が生じてくると共に、N-mycの発現は外側の神経上皮細胞層で弱まり始め、内側の層での発現が目立つようになってきた。そして、Stage 36（図3-1E~G）では、N-mycの発現は神経節細胞層と、アマクリン細胞層に限られるようになった。しかも、アマクリン細胞では細胞質と核の両方が、神経節細胞は細胞質が主に染色された（図3-1H、I）。Stage 42まで発生が進むと、ニューロフィラメントの発現が強くなることから神経節細胞の分化も充分進み、それと共にN-mycの発現もほとんど認められなくなった。

(6) 神経冠細胞での N - m y c の発現

S t a g e 12 胚の H N K - 1 (神経冠細胞のマーカー抗体 (Bronner-Fraser, 1986)) との二重染色から、頭部、胴部とも神経管背部から遊走してきた神経冠細胞は、N - m y c を強く発現し、またそのタンパク質産物が核に局在するのが観察された。また、神経冠細胞はビンキュリンでも良く染色された (図 2 - 5 A ~ C)。

(7) 神経冠細胞由来の各組織での発現

神経冠由来の細胞は、その分化の過程で N - m y c の発現に差異が認められた。組織切片上では、交感神経節や、後根、前根のシュワン細胞では早々に (S t a g e 21 頃) 発現が低下する (図 2 - 5 D、E) のに対し、脊髄神経節ではより長期間の発現が観察された。S t a g e 21 では、神経節全体でやや弱いながらも抗 C N 32 染色が認められ、しかもそれは核に局在していた。その後 N - m y c の発現は強くなり、S t a g e 29 では核が強く染色されていた (図 2 - 5 F、G)。しかし S t a g e 29 以降、感覚神経細胞とサテライト細胞と呼ばれるグリア細胞への分化が進んでくると、N - m y c タンパク質の核への局在に変化が見られた。S t a g e 31 で先ず、大きな細胞体を持つ成熟の進んだ神経細胞で、抗 N - m y c の染色が核だけでなく細胞質にも同程度に認められるものが現れ始めた。そして S t a g e 36 では、D A P I で濃く染色される小さな核を持つサテライト細胞はもはや抗 N - m y c 抗体では染まらず、抗ニューロフィラメント抗体で染色される神経細胞 (D A P I で薄く染色される大きな丸い核を持つ。) は、核ではなく細胞質が抗 C N 32 抗体によって染色された (図 2 - 5 H、I)。この S t a g e 以降、この細胞質の染色も弱まっていく。すなわち、胴部神経冠細胞由来の組織では、脊髄神経節の感覚神経細胞でのみ N - m y c タンパク質が細胞質に局在を変えることが解った。また、消化管に分布した副交感神経に分化する細胞では、S t a g e 21 では発現が弱かったものの、S t a g e 31 では平滑筋に隣接して発現が比

較的強まっていた（図2-5 J、K）。

頭部神経冠細胞由来組織では、三叉神経節などの神経節でもN-mycの発現がみられたが、それと共に頭部の間充織でもN-mycの発現が認められた（Stage 19～24）（図2-6）。その発現の仕方は後に述べる肢芽でのそれとよく似ており、特に上顎突起、下顎弓では表皮に面した先端部で強く基部で弱くなっている（図2-6 B、D）、軟骨への分化が進んでいるところでは発現が弱まっていた（図2-6 E）。他の内臓弓（舌骨弓、鰓弓）では、表皮に近接している間充織と咽頭嚢の周囲で発現がみられた（図2-6 C）。

（8）中胚葉性組織での発現；体節での発現

Stage 7以降、体節でのN-mycの発現は均一であったが、3日胚頃から変化が認められ始めた。Stage 21では、硬節や真皮節由来の細胞ではN-mycの発現は低下していたが、筋節では分化の進んでいない最も背側の部分で比較的強い発現がみられた（図1-3 A、E）。Stage 24でもまだ発現が残っていたが、Stage 26では低下してしまっていた。

（9）中胚葉性の組織での発現；羽芽、血管

真皮節から遊走してきた真皮を作る細胞ではN-mycの発現はほとんど認められないが、そのうち羽芽の形成と共に再びN-mycが発現してくるのが観察された。Stage 36では、羽芽の基部で凝集している細胞群で発現しているのが認められた。このN-mycを発現している細胞は、ビンキュリンも強く発現していた（図2-7 C～E）。

血管内皮細胞は、発生過程を通じて発現がほとんど見られなかった。しかし、Stage 21では、背側大動脈の内皮細胞の周囲に凝集している細胞群で比較的強い発現がみられた（図2-7 A、B）。

(10) 中胚葉性の組織での発現；肺、消化管

未分化中胚葉から、側板中胚葉、内臓中胚葉と引き続いてN-mycの発現が認められた。そして、肺、消化管の形成の過程でもN-mycは発現していたが、発現領域は中胚葉由来の間充織と体腔壁に限られ(Stage 19~24)(図1-3G)、内胚葉性の上皮では咽頭上皮で弱い発現がみられるのみであった。更に器官形成が進むと、N-mycの発現はそれぞれの器官の中で局在化してくる。気管、気管支、肺、消化管のいずれにおいても抗CN32抗体で染色されたのは、上皮の周りに凝集している細胞であった(Stage 31~36)(図2-8)。加えて、消化管では、おそらくは平滑筋の前駆細胞と思われるやはり凝集した細胞群がN-mycを発現していた(Stage 31)(図2-8A、B、図2-5J、K)。またStage 31について調べたところでは、消化管における中胚葉性の間充織細胞は、N-mycと共にビンキュリンを強く発現しているのが観察された(図2-8B、C)。

(11) 中胚葉性の組織での発現；肢芽

肢芽でのN-mycの発現については、第4章で詳しく述べる。

考察

N-myc遺伝子は、それがコードするタンパク質がDNA結合モチーフを持ち、核に入ることなどから、他の遺伝子の発現調節をしていることは間違いないと思われる。しかし、どのような現象に関与しているのかということになると、依然として解らないままであった。胚発生期に発現が高いことから、おそらくは細胞の増殖や分化に関わりがあるのだろうと推測されるのみであった(for review, Lüscher and Eisenman, 1990)。

今回の解析で、分裂を終えた神経細胞に N - m y c の強い発現がみられた。このことは、N - m y c が細胞の増殖に関係していないことを示している。M y c 遺伝子ファミリーの細胞の増殖との関連については、これまでも調べられている。M u g r a u e r らは、*in situ* ハイブリダイゼーションによって発生期のマウスの腎臓について c - m y c、N - m y c、L - m y c の発現を調べると共に、B r d U の取り込みから細胞の増殖との関連も調べている (M u g r a u e r and Ekblom, 1991)。それによれば、3つの m y c 遺伝子はそれぞれ異なる発現分布を示し、c - m y c は B r d U の取り込み (即ち細胞増殖) と良く対応して発現されるが、N - m y c は間充織細胞が腎細管に分化する際に一過的に発現される。また、やはりマウスを用いて同様な実験を行った H i r n i n g らや Y a m a d a らもそれぞれが、脳の皮質形成や口腔の形態形成時に、N - m y c 遺伝子が細胞の増殖と言うよりは細胞の分化に関連した発現をする事を示している (Hirning et al. 1991, Yamada et al. 1992)。

分化に伴う N - m y c の発現の減少は、今回の解析では上顎原基や肢芽で明かであった。N - m y c は間充織で強く発現されているが、軟骨の形成に先立つ細胞凝集の起こっている領域で発現が無くなる。これらのことは、N - m y c の発現の消長が、細胞の分化と深く関わっていることを示している。

しかし、ひとくちに細胞分化といっても、そのプロセスは細胞種によっても異なるし、複雑な多くの現象を含んでいることを考えると、十分な説明となっているとは言い難い。また、N - m y c の発現は細胞種によって長く続く場合もあれば、そうでない場合もある。今回、N - m y c 遺伝子の発現パターンをさらに詳しく検討してみると、大きく分けて2つの役割が考えられた。

一つは、N - m y c の発現が、それを発現している細胞集団で意味を持つと考えられる場合である。例えば大脳についてみると (図 2 - 3)、全体が神経上皮細胞で占められている早い時期には、N - m y c は全体で発現されている。後に層構造が形成されてくると、神経上皮層では発現が無くなり、神経

へ分化した細胞や、分化した細胞の層へ移動しつつある神経芽細胞と思われる細胞で発現が見られるようになる。さらに発生が進むと、N-mycの発現は分化した神経細胞と上皮細胞でみられ、グリア細胞からなるとされる層では発現はみられない。層構造と関連した発現は脊髄や網膜などでも見られ、細胞が集団を作り、この場合では層構造を形成する際にN-mycが働いている可能性が考えられる。

同様のことは、N-mycを発現している他の器官についても言える。消化管では、N-mycの発現が平滑筋の前駆細胞の層にみられ、それと共に筋層の外側に密着して分布している副交感神経細胞でもN-mycが発現されている。このことから、平滑筋細胞が周囲の間充細胞から分離して、副交感神経と共に細胞集団を作るのにN-mycが働いていると考えられる。また、筋層と副交感神経細胞では共に、ビンキュリンが強く発現されている。ビンキュリンは、接着班や接着結合の部分にあり、細胞外と細胞内骨格を結びつけることで細胞の細胞間や細胞-基質相互作用に関与している分子である。羽芽間充細胞基部や神経冠などでもN-mycとビンキュリンの発現が重なっているが、必ずしも全ての組織でビンキュリンとN-mycの発現が一致しているわけではないので、N-mycがビンキュリンの発現を直接制御しているとは言えない。しかしN-mycが発現している細胞は、細胞集団を作る際に接着性を変化させていると考えられる。

N-mycの発現と細胞の接着性に関する報告は、これまでもある。神経芽細胞腫でN-mycを過剰発現させると、細胞接着分子であるN-CAMの発現が低下し、N-mycを抑制するとN-CAMの発現が高まる (Akeson and Bernard, 1990, Whitesell et al., 1991)。中枢神経系やいくつかの組織では、細胞の集団、層構造が形成されるために、N-mycによってN-CAMの発現が調節されることが重要なのかも知れない。N-mycを失ったマウス胚の中枢神経系の皮質形成が貧弱になる (第5章参照。図5-1、2) のは、

N-myc が層構造の形成に関与しているとの考えをさらに支持している。

もう一つ考えられる N-myc の働きは、N-myc を発現している細胞に隣接している、別の組織に対してのものである。ニワトリ N-myc は、肺や消化管の上皮に面した間充細胞でも発現している。これらの器官では、上皮と間充の相互作用が器官形成に必要であることは広く知られているところである。Moens らは、N-myc に変異を導入したマウスの胚で、気管支の分岐が不十分になることから上皮と間充の相互作用時のシグナル伝達への関与の可能性について述べている (Moens et al. 1992)。また、N-myc を失ったマウス胚では気管支が分岐できない、胃が形成されない等の異常を示すことから (第 5 章参照、図 5-3)、N-myc が組織間相互作用に関与している可能性は大きい。

何れにせよ、ここで明らかにしたニワトリ N-myc の発現の特異性は、例えば N-myc 遺伝子と他の遺伝子との関わり合いを考える上で重要な知見となるのみでなく、胚操作や遺伝子導入など今後の解析の際に非常に有用な情報となるであろう。

第 3 章

神経細胞の分化過程における N - m y c タンパク質の細胞内局在の変化

序

転写調節因子は DNA に結合することで機能するため、ホメオボックスやヘリックスループヘリックスなどの DNA 結合モチーフを持っている。それに加えて、多くの場合核移行シグナルを持っており、おそらくは積極的に核へと運ばれる。N - m y c タンパク質もまた、転写調節因子をコードしていると考えられており、これまでに N - m y c タンパク質が核に局在する事が報告されている (Ikegaki et al. 1986, Slamon et al. 1986, Ueno et al. 1988)。しかし前章でも触れたように、脊髄神経節などの幾つかの細胞種では N - m y c タンパク質が細胞質にあることを見い出した。N - m y c タンパク質が本来信じられてきた核でなく細胞質に局在する事には、今まで知られていなかったような何らかの重要な意味があるのかも知れない。だとすれば N - m y c の機能について新たな視点を与えることになるだろう。そこで N - m y c タンパク質の局在について詳細に調べたので、この章ではそれについて述べることにする。

結果

(1) 神経性網膜での抗 N - m y c 抗体染色

神経性網膜で N - m y c の発現が高いことは、既に我々のグループによって

示されている (Sawai et al. 1990)。N-myc タンパク質の局在が細胞質にみられた場所の一つは、この神経性網膜であった。ニワトリ 6 日胚 (Stage 26) の網膜では、DAPI と比較すると良く解るのだが、抗 CN 32 抗体によって神経性網膜のほぼ全ての細胞の核が染色された (図 3-1 A、C)。また、色素性網膜は染色されなかった。

10 日胚 (Stage 36) になると、層構造の形成と細胞の分化に伴って、抗 CN 32 による染色は内側の神経節細胞層とアマクリン細胞層に限られるようになった (図 3-1 E~G)。しかし、その染色は、神経節細胞では核ではなく細胞質側のみにもみられた。また、アマクリン細胞では細胞質と核の両方が染色された (図 3-1 H、I)。この後発生が進むと、抗 CN 32 による染色の領域特異性は変化することがなく、14 日胚 (Stage 40) の網膜はほとんど染色されなかった。

この抗 CN 32 抗体による染色は予め抗原と反応させておくとうえ (図 3-1 D)、N-myc タンパク質の内の CN 32 とは異なる領域を抗原として作成した抗 CN 12 抗体の染色によっても見られることから、N-myc タンパク質の局在の変化を特異的に検出していると考えられた。

そこで、N-myc タンパク質が細胞質側に存在することを確認する意味で、さらにウェスタンブロッティングを行った (図 3-2)。神経性網膜を 6 日胚と 10 日胚から単離し、ホモゲナイズして核と細胞質の 2 つのフラクションに分けた。そして各フラクションを抗 CN 32 抗体で免疫沈降後、ウェスタンブロッティングで解析した。また、ネガティブコントロールとして、14 日胚の肝臓も同様に処理、解析した。その結果、6 日胚の神経性網膜では核フラクションにのみ約 70 kDa のバンドがみられたが (lane A、B)、10 日胚では核、細胞質の両方のフラクションに同じ分子量のバンドがみられた (lane C、D)。また肝臓ではバンドはみられなかった (lane E、F)。これらの結果は、組織切片上での観察 (図 3-1) と一致している。なお各フラ

クションの純度については、細胞質フラクションを位相差顕微鏡によって観察して核の混入がないことを確認し、さらに抗ニューロフィラメント抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、細胞質フラクションにのみバンドがでることによって確認した。

(2) 脊髄神経節における N-myc タンパク質の局在変化

細胞質側の N-myc タンパク質の局在は、マウスでも観察された。抗 MN 14 抗体 (Kato et al. 1990) による染色を行ったところ、10.5 日胚では、脊髄、脊髄神経節とも、我々が 9.5 日胚で報告した (Kato et al. 1991) のと同様に、N-myc タンパク質は核に局在していた (図 3-3 A ~ C)。12.5 日胚になると、脊髄では神経腔に面した神経芽細胞から成る層と後角に発現がみられ (図 3-3 D)、N-myc タンパク質は核に局在していた (図 3-3 E、F)。一方脊髄神経節では、一部の細胞で N-myc タンパク質が細胞質側に局在していた。この細胞は、大きな細胞体を持つ、DAPI による核染色が弱い、抗ニューロフィラメント抗体で染まる等の特徴から、感覚神経であると考えられた。また、この時期に *in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、脊髄神経節に N-myc の mRNA が検出されることから、新たに翻訳された N-myc タンパク質が細胞質側に蓄積しているものと考えられた。

同様のことはニワトリについても見られた。6 日胚 (Stage 29) では脊髄神経節の全ての細胞の核が染色されたが (図 2-5 F、G)、10 日胚 (Stage 36) 以降ではやはり感覚神経でのみ N-myc タンパク質を細胞質に持っていた (図 2-5 H、I)。一方、感覚神経細胞をとりまくサテライト細胞は染色されなかった。このような染色は、培養に移した脊髄神経節で、よりはっきりと観察された (図 3-4)。

(3) 神経冠細胞の培養下での細胞分化と N-myc タンパク質

発生過程での N - m y c タンパク質の局在変化は、神経冠細胞の培養でも再現された。2日胚のウズラの神経冠細胞を単離し、神経細胞の分化に好ましい条件で培養後、抗 C N 3 2 を用いて染色した。培養初期には、N - m y c タンパク質は核にみられた。これらの細胞はニューロフィラメントを発現しておらず、形態的にみても分化が進んでいなかった（図 3 - 5 A ~ D）。数日間培養を続けると、色素細胞や神経細胞が分化してくるが、ニューロフィラメントを発現している神経細胞では N - m y c タンパク質が細胞質にみられた（図 3 - 5 E ~ H）。

（4）ニワトリプルキンエ細胞での N - m y c の発現

ニワトリの小脳については、S t a g e 3 6 以降外顆粒層、内顆粒層にある顆粒細胞とその前駆細胞では、N - m y c タンパク質が核にあるのが観察された（図 2 - 4）。しかし S t a g e 3 8 以降、その特徴的な樹状突起や、大きな細胞体、ニューロフィラメントの強い発現から同定されるプルキンエ細胞で、N - m y c タンパク質が細胞質に局在していた（図 3 - 6）。しかもこの染色は、プルキンエ細胞がまだ未熟な小脳葉先端部付近では薄く、より分化の進んでいる基部側では濃かった。すなわち、プルキンエ細胞の成熟に伴って、N - m y c タンパク質が新たに翻訳されて細胞質に局在するものと考えられた。

考察

多くの転写調節タンパク質が核に移行することが知られている。しかしその一方で、幾つかの調節因子が細胞質に留まった状態を持つことが知られるようになってきた。例えば r e l 遺伝子ファミリー（Baeuerle and Baltimore, 1988a, 1988b, Roth et al. 1989, Rushlow et al. 1989, Steward. 1989, Capo

bianco et al. 1990) や *fos* がそれに当てはまる (Roux et al. 1990)。今回、N-myc タンパク質もまた細胞内の局在の変化による調節を受けていることが明かとなった。しかも核から細胞質への変化は、幾つかの特定の神経細胞種の分化と対応していた。

N-myc タンパク質を核に持つようになる細胞種は、神経性網膜の神経節細胞や、脊髄神経節の感覚神経、小脳のプルキンエ細胞といった大きな細胞体を持ったものに限られていた。N-myc タンパク質は、これらの細胞の成熟と時を同じくして、わざわざ新たに合成されて細胞質に蓄積される。このような観察から、細胞質にある N-myc タンパク質は特定の神経細胞の成熟に対して、何らかの積極的な機能を持っていると推測されるのである。

最近、myc ファミリータンパク質が、Max / Myb と呼ばれるタンパク質とヘテロ二量体を形成して塩基配列特異的に DNA に結合することが示された (Blackwood and Eisenman. 1991, Prendergast et al. 1991)。この報告にあるような N-myc タンパク質の他のタンパク質と結合する特性が、N-myc タンパク質の局在の変化と細胞質側での機能についてのメカニズムを考える上でのヒントとなるかも知れない。細胞質側に N-myc が蓄積する場合、おそらくは Max やそれに類するタンパク質、またはもっと別の因子と結合している可能性が考えられる。例えば NF- κ B では、I- κ B と結合することで核移行を妨げられている。そして、I- κ B がリン酸化されると外れて核にはいり、DNA に結合して機能することになる (for review, Blank et al. 1992)。このような、核移行シグナルを覆ったり、タンパク質を修飾することによる調節が N-myc の場合にも働いている可能性がある。その一方で、N-myc タンパク質が他のタンパク質ともっと複雑な複合体を作って、細胞質側につなぎ止められているのかも知れない。グルコシルチコイド受容体の場合は、リガンドと結合していないときには HSP 90 と結合し、HSP 90 がさらにアクチン繊維とも結合することで細胞質につなぎ止められている。そして

ヒートショックなどの刺激によって外れ、核に移行する (Miyata and Yahara, 1991, Sanchez, 1992)。同様のメカニズムの存在も考えられるが、HSPそのものはN-mycの局在とは直接関係ないようである。脊髄神経節の培養に対し、ヒートショックを行っても変化は認められない (Watanabe, unpubrished data)。何れにせよ、N-mycと結合しているタンパク質を同定する事が、メカニズムを知るうえで今後の一つの課題であろう。

細胞質側のN-mycタンパク質の役割については、2つの考え方が出来るであろう。一つは、N-mycが神経細胞の成熟を阻害するため、細胞質に排除されているというものである。しかし、プルキンエ細胞では新たに発現を初めておきながらN-mycタンパク質を細胞質に貯め込んでしまうことから、もっと積極的な機能を考えた方が良いのではないか。もし単なる機能抑制でないとすれば、他のmycファミリータンパク質との関わりについて考察することがヒントを与えてくれるかも知れない。

N-myc以上によく研究されているc-mycでは、母性に発現し、細胞質に蓄積されているc-mycタンパク質が受精と共にリン酸化され、核に移行することがGusseらによって報告されている (Gusse et al, 1989)。おそらくc-mycは、N-mycとは別のメカニズムで調節されているのであろう。例えば、Jaffredoらはニワトリのc-mycタンパク質の発現を見ている (Jaffredo et al, 1989)。それによれば、10日胚の神経性網膜においてc-mycタンパク質はN-mycと同じ細胞層で発現しているが、N-mycと異なり、核に局在している。また10日胚の脊髄神経節細胞の培養でも核に局在しているという。

また最近、Max遺伝子の選択的スプライシングによって出来る、 Δ Maxタンパク質の存在が報告されている (Mäkelä et al, 1992)。それ自身で核に移行できるMaxタンパク質とは異なり、 Δ Maxは核移行シグナルを欠いているためにc-mycタンパク質とのヘテロ2量体を形成することでしか核に

はいることが出来ない。また、 myc / Max もしくは、 $myc / \Delta Max$ は転写を活性化するが、 ΔMax は同じ塩基配列に結合して転写抑制をするのではないかと考えられている。加えて、 $N-myc$ タンパク質もまた、 Max と結合できることが示されている (Blackwood and Eisenman, 1991, Wensel et al., 1991)。よって、細胞質に多量にある $N-myc$ が Max や、 ΔMax と2量体形成をする事により、 Max やそれに類するタンパク質と核にある $c-myc$ タンパク質などとの接触頻度を調節し、その活性を制御しているのかも知れない。

最初ほとんどの未分化な神経の前駆細胞で、 $N-myc$ タンパク質は核にある。しかしそのうちの一部の神経細胞種でのみ、その分化、成熟過程で細胞質に局在が変わる。このような多様な $N-myc$ タンパク質の活性制御が、神経分化にとってどんな意味があるのかは、 $N-myc$ タンパク質の改変によってその局在性を変えるなどの遺伝子操作を、トランスジェニック動物や、培養細胞への遺伝子導入等で行うことで明らかに出来るかも知れない。何れにせよ、この発見は myc 遺伝子ファミリーの今後の研究に新たな視点を与えることになるだろう。

第 4 章

肢芽の形態形成と N - m y c 遺伝子の発現調節

序

肢芽は構造が比較的簡単で、構成する細胞種も少なく、また胚操作を用いた解析が行いやすいといった利点がある。そのため、古くから形態形成や細胞分化の研究対照となり、多くの知見が得られている。細胞の増殖と分化については、壁側中胚葉由来の間充織と肢芽先端部の外胚葉即ち外胚葉性頂堤 (Apical Ectodermal Ridge; 以後 A E R と呼ぶ。) の相互作用に基づく活発な細胞増殖の見られる前進帯の維持、間充織細胞の軟骨への分化と表皮外胚葉によるその阻害が良く研究されている (for review, Ide, 1990)。また形態形成については、肢芽に前後軸を与える Z P A (Zone of Polarizing Activity) の存在が知られていたが、肢芽の後端部に位置する Z P A と良く似た効果を持つレチノイン酸 (以後 R A と略す。) の発見 (Tickle et al. 1982)、肢芽におけるホメオボックス遺伝子群の軸形成への関与 (for review, Izpisua-Belmonte and Duboule, 1992) などについて、分子生物学的な解析が数多く行われるようになってきた。

ビタミン A の誘導体である R A は、形態形成や細胞の分化に影響を与える生理活性物質として知られている。胚性腫瘍細胞や神経芽細胞腫などの未分化細胞株に、R A を与えると分化が誘導される。その際に、R A 受容体など色々な遺伝子の発現に変化が起こり、N - m y c 遺伝子は一過的な発現の低下を示す (Jacobovitz et al. 1985, Sejersen et al. 1986, Kato et al. 1990)。ま

た、発生期に RA を投与すると、口蓋の形態異常 (Shenefelt, 1972) や、ホメオボックス遺伝子の発現パターンの変化が起こる (for review, Izpisua-Belmonte and Duboule, 1992)。このような知見と共に良く知られているのは、ZPA と同様に肢芽の前端部に RA を染み込ませたビーズを移植すると、鏡像対照の重複肢を形成する事である (Tickle et al., 1982) (図 4-2)。

上に述べたような数多くの知見と利点から、肢芽は形態形成や細胞分化、組織間相互作用などに関して N-myc 遺伝子の解析を行う実験系としても、非常に有効であると考えられる。そこで私は、肢芽の形態形成過程における N-myc 遺伝子の発現分布を明らかにすると共に、どのようなメカニズムで N-myc の特徴的な発現様式が実現されるのかを調べた。さらにその結果からどのような働きをしているのかを考察した。

結果

(1) 肢芽における N-myc 遺伝子の発現分布

これまでに、肢芽での N-myc の発現はニワトリ 3.5 日胚やマウス 9.5 日胚について、私を含むグループによって報告されている (Sawai et al., 1990, Kato et al., 1991)。しかしいかなる実験を行うにしても、発生過程を追って N-myc の発現がどのように変わって行くのかを調べておく事は必須であると考え、ニワトリを材料として解析を行った。その結果 Stage 17 で既に、後に肢芽の形成されるであろう体壁部分の壁側中胚葉に N-myc の発現がみられた (図 4-1A)。発生が進んで Stage 19 になると、これまで報告されているとおり、間充織先端部で強く基部で弱い、表皮や AER では発現が認められないといった発現パターンが観察された (図 4-1B)。加えて、正中断面や横断面での解析から、前後軸や背腹軸での発現の勾配は無い事

が示された（図4-1C）。さらに発生が進むと、肢芽の伸長と軟骨形成に先立つ細胞凝集が起きるが、Stage 24以降この細胞凝集の起きている部分ではN-mycの発現は減少してしまうのがみられた（図4-1D）。また、非軟骨性の間充織でも基部の方からN-mycの発現が徐々に失われていき、例えばStage 31では、N-mycを発現する細胞は先端部分に僅かに残るのみであった。なお、このような発現の仕方は、前、後肢芽とも原則として共通であった。

（2）RAの投与によるN-mycの発現の変化

Stage 19のニワトリ胚右前肢芽の前端部に3通りの濃度のRAを含ませたビーズを移植した。そして12時間後と24時間後に固定して、*in situ*ハイブリダイゼーションによってN-mycの発現を調べた（図4-2）。なおRAの濃度については、コントロールのDMSO（RAの溶媒）のみ、1mg/ml、10mg/mlで行った。これらの濃度のビーズを移植して9日間ふ卵した後、アルシアングリーンで染色して観察すると、指のパターンはDMSOのみでは変化が無く234、1mg/mlでは2234、10mg/mlでは43234の重複肢を形成するものが大部分であった。即ち、投与したRAの濃度は、生理活性を持つ範囲のものであることが確認された。RA投与後12時間後の1mg/ml、10mg/mlでのN-mycの発現は、DMSOのみと比較して非常に低下しており、特に後者の方ではセンスプローブを用いたネガティブコントロールと同程度にまで下がっていた。そして、この発現の低下は、肢芽の全域にわたっていた。RA投与後24時間ではどの条件の肢芽でも同様に、N-mycの強い発現がみられ、コントロールと同様のレベルまで回復していた。

（3）N-mycの発現に対するAERの影響

Stage 19 の右前肢芽からタングステン針を用いて AER を取り除き、12 時間ふ卵した後固定した。そして *in situ* ハイブリダイゼーションによって N-myc の発現を調べた。その結果、左肢芽をコントロールとしてみた場合、AER の除去によって右肢芽の発達は抑制されたものの (図 4-3B)、N-myc の発現には違いが認められなかった (図 4-3A)。

考察

肢芽において N-myc 遺伝子は、先端部で強く基部で弱い、端部で強く中央部で弱いという発現の仕方をしていた。このような発現様式はどういったメカニズムで実現されるのだろうか。RA の投与を行うと、肢芽における N-myc の発現は一過的に低下し、その後回復した。つまり、RA を介した N-myc 遺伝子の発現制御機構が、培養細胞株だけでなく実際の発生過程においても機能していることが示唆される。Noji らは同様な実験を行い、RA 受容体の発現を観察している (Noji et al. 1991)。RAR β は N-myc とはちょうど反対の発現分布を示し、通常肢芽の基部側で発現があるのだが、RA の投与によって肢芽全体に発現が誘導される。そして、この反応もやはり一過的なもので、しばらくすると発現は基に戻ってしまう。このことから、N-myc の発現は RAR β によって抑制される為に、基部側で発現が弱くなっているのかも知れない。

また、軟骨形成に先立つ細胞の凝集が始まると、その部分で N-myc の発現が低下する。これは肢芽だけでなく、顎の発達の過程においても見られたことである (第 2 章、図 2-6B)。この軟骨の分化は表皮からの拡散性の因子によって抑制されており、表皮から離れた部分でのみ軟骨が形成されることを可能にしているのは、広く知られている。つまり、N-myc の発現が表皮か

らの何らかのシグナルによって誘導されている可能性がある。

それでは、肢芽において *N-myc* 遺伝子はどのような役割を持っていると考えられるのか。*N-myc* の発現は、AERの直下に位置した最も分化が進んでいない、活発に分裂増殖している間充織（前進帯）で顕著である。従って、発現分布からは *N-myc* が細胞の増殖に関与している可能性が考えられた。前進帯の細胞が活発に増殖するためには、AERからの何らかのシグナルを受けることが必要であることが解っている。しかし、AERを除去してやっても *N-myc* の発現に変化がみられないことから、*N-myc* 遺伝子がAERの誘導によって発現し、細胞増殖を直接的に活性化する役割を持っているとは考え難い。

N-myc の発現の減少と軟骨の分化とが関連していることから、*N-myc* が間充織細胞の軟骨分化を抑制していることが考えられた。胚性腫瘍細胞や神経芽細胞腫の細胞株などにRAを与えると細胞の分化が誘導され、その際に *N-myc* の発現が一過的に減少する (Jacobovitz et al. 1985, Sejersen et al. 1986, Kato et al. 1990)。しかし *N-myc* を構成的に発現させた胚性腫瘍細胞でも、RA処理によって分化が進む (Kato et al. 1990)。また、肢芽にRAを与えて *N-myc* の発現を抑制しても、肢芽全体が軟骨化するわけではない。即ち、*N-myc* の発現によって、間充織が分化抑制を受けているのではないだろう。

それでは、*N-myc* 遺伝子はどのような役割を持っているのだろうか。*N-myc* 遺伝子を標的遺伝子組換えによって失ったマウス胚では、指板が小さく、AERや表皮の形態にも異常が観察された（第5章参照、図5-5）。AERや表皮自体では *N-myc* の発現がみられないので、消化管などと同様 *N-myc* が組織間相互作用のシグナル伝達に関与して、この場合肢芽の形態形成に働いていると考えられる。実際、AERが機能的にも形態的にも維持されるためには、間充織の存在が必要であることが知られている。

以上のことをモデルにまとめてみた(図4-4)。N-mycは未分化な間充織で発現することから、表皮外胚葉からのシグナルを受けて発現しているのかも知れない。その一方で、RAを介したRAR β の発現と軟骨細胞への分化の過程で発現が失われ、肢芽先端部で強く、基部、中央部で低い発現パターンが実現される。そしてN-mycを発現している細胞は表皮外胚葉やAERに働きかけ、肢芽の形態形成に関わっていく。

上に述べたのは単なるモデルに過ぎない。しかし、第2章で述べた様々な組織でのN-mycの発現分布や、第5章のN-mycを失ったマウス胚の表現型の解析結果は、N-mycが組織間相互作用への関与の可能性を示しており、今後の解析によってその妥当性が明らかになることを期待している。

第 5 章

標的遺伝子組換えによって *N-myc* を失ったマウス胚の表現型の解析

序

近年、マウスについて多分化能を保持した胚性幹細胞 (ES 細胞) が株化され、マウスの遺伝子操作が活発に行われるようになってきている。そして、ES 細胞の中で相同的遺伝子組換えがある頻度で起こることが解り、それを応用してある特定の遺伝子に変異を導入することが可能となった。

Sawai らはこの実験系を利用して、ES 細胞中で *N-myc* 遺伝子に挿入突然変異を起こした株を樹立した。そして、*N-myc* 遺伝子の 2 つの対立遺伝子両方に変異を持ったホモ接合体を作出し、それが胚発生期に死亡することを報告している (Sawai et al. 1991)。

私は、*N-myc* の活性を失ったこのマウス胚 (以下変異体と呼ぶ) がどのような表現型を示すのかを主に組織学的に解析し、発現の時期、組織特異性との関連について考察した。

結果

10.5 日胚までは、野生型も変異体も外見上違いは認められなかった。しかし、11.5 日胚では頭部、口蓋、四肢が未発達であることを見て取ることが出来た。12.5 日になると変異体は死んでしまうので、主に 11.5 日胚

について組織切片を作成し、観察した。その結果、様々な器官で異常が観察され、また変異体ではアルシアンブルー染色が野生型よりも濃くなっていた（図5-2、4、5）。

（1）中枢神経系

脳、脊髄共に、正常と同じ構造が一揃い存在していた。全体に貧弱な印象を受けたが、それは層構造が全体に薄いためであった。大脳半球、中脳など全体に小型で、線条体も2/3程度の厚さしか無かった。大脳半球では、この時期には未分化な神経上皮層の外側に、分化し始めた神経細胞からなる皮質層がみられたが（図5-1 A、B）、変異体ではほとんど見られないか有っても極く薄いものであった（図5-1 C、D）。

脊髄も層構造が薄くなっていた（図5-2 A、C）。しかし、細胞の増殖像は野生型と比べても大きな違いはなく、細胞数でみてもやや少ない程度であり、変異体では細胞の密度が高くなっていた。また、変異体では、分化した神経細胞の層が薄くなっており、白質層がさらに減っている、神経に分化途上にある細胞が神経上皮層にやや食い込んでいるなどの特徴がみられた（図5-2 D）。すなわち、分化した細胞の層が薄いという、脳と共通の特徴を示した。しかし、抗ニューロフィラメント染色を行うと、神経細胞層、白質層、とも良く染色されることから、少なくともその層に移動した細胞の分化はある程度進んでいると考えられた。

（2）末梢神経系

神経冠細胞に由来する、末梢神経系でも異常がみられた。脊髄神経節、交感神経節、副交感神経のどれも欠けることなく存在していたが、特に脊髄神経節は明らかに小さかった（図5-2）。この時期の脊髄神経節では、大きな核と細胞体を持つ感覚神経細胞と、小さな核のサテライト細胞に分化してきている

が、形態的に同定できる感覚神経細胞の数が減少していた。また、個々の感覚神経細胞の大きさにも違いがみられ、細胞質が少なく、核もやや小型であることから、神経としての成熟が遅れているとも考えられた（図 5 - 2 D）。しかし、抗ニューロフィラメント染色で見る限り、中枢神経系と同じく神経細胞もある程度分化は進んでいた。また、このような脊髄神経節の異常は、発生の遅れている尾部側でははっきりしないことから、分化の進行と共に現れてくるものと考えられた。

（ 3 ） 肺、消化管

肺、消化管ともに発生の遅れが観察された。正常の肺ではこの時期に、気管支の分岐が始まるのだが、それがみられなかった。消化管については特に、変異体で胃の発達がみられなかった（図 5 - 3）。

（ 4 ） 中腎

変異体では中腎の発達が遅れており、管形成が不十分であるために中腎細管の数が減少していた（図 5 - 3）。

（ 5 ） 心臓

変異体では心臓全体が小さいだけでなく、心室の隔壁がない、心筋層が薄い、等の異常がみられた（図 5 - 4 A、B）。

（ 6 ） 肝臓

肝臓は、野生型ではいくつかの小葉に分かれているが、変異体では大きさが小さいだけでなく小葉の分岐がみられなかった。肝細胞の形態そのものには大きな違いはみられなかった（図 5 - 4 C、D）。

(7) 肢芽

変異体の肢芽は指板の発達が悪いため、野生型に比べて細くなっていた。組織切片でみると間充織、外胚葉共に細胞密度が高まっており、酸性ヘマラウン、エオシン、アルシアンブルーの染色が濃くなっていた。加えて、外胚葉性頂堤に若干の形態的な異常がみられた。野生型に比べて先端が丸まっており、内側の間充織の方にやや落ち込んだ形になっていた(図5-5)。

考察

器官形成期のマウスにおけるN-myc遺伝子の発現はこれまでも幾つか報告があり、私も調べている(Mugrauer et al. 1988, Kato et al. 1991, Hirning et al. 1991, Mugrauer and Ekblom. 1991, Wakamatsu, unpublished data)。今回N-mycを失った変異体マウスで異常の認められた器官は、ほとんどの場合N-mycの発現の認められる部分であることは、これらの異常がN-myc遺伝子が機能していないことに因っていることを示していると考えられる。

変異体では中枢神経系で層構造の形成が劣ってしまっていた(図5-1、2)。層構造の形成のためには、細胞間相互作用に基づく神経芽細胞やグリアの移動が必要である。変異体でみられたこの表現型は、N-myc遺伝子が細胞の接着性の変化に関与することで層構造の構築に関与しているとする、発現からの推測を支持している。変異体の中枢神経系や脊髄神経節、肢芽の間充織などでは、細胞密度が野生型に比べて上がっている(図5-1、2、5)こともこの考えに合致するといえるだろう。

発現から見たN-mycの役割についてのもう一つの推測、即ち組織間相互作用への関与についてはどうだろうか。変異体では、気管支に分岐がみられな

い。胃の形成や、中腎細管の発達なども、正常胚と比べて明らかに劣っている。これらの器官は、第2章でも述べたように器官形成時に上皮組織と間充織の相互作用が必要であることが知られており、やはり *N-myc* 遺伝子の影響が組織間の相互作用にあることを示していると思われる。

さらに、ここまでで見てきた変異体の異常の中には、*N-myc* の発現していないことが知られている組織で認められるものもあった。たとえば、肝臓や肢芽の外胚葉（特に AER）等がそれに当たる（図5-4、5）。このことは、*N-myc* の機能について考える上で極めて興味深い。肝臓といっても、内胚葉性の肝細胞では *N-myc* の発現はみられないが、その周囲にある中胚葉由来の間充織細胞では発現がある（Kato et al. 1991）。また、肢芽でも、AER では *N-myc* の発現がないが、その直下の間充織細胞では非常に強い *N-myc* の発現がある（Kato et al. 1991）。つまり、*N-myc* の発現が、それに近接した細胞に影響を与えているのである。このことも、*N-myc* が組織間の相互作用に働いていることを示唆している。

N-myc の発現はあっても（Kato et al. 1991, Hirning et al. 1991）形態的な異常がほとんど見られない組織（例えば腸や眼など）があることや、心筋層の発達が未熟になること（図5-4 A、B）、中枢神経系や脊髄神経節で神経細胞の分化、成熟がやや劣っていること（図5-1、2）などを考え併せると *N-myc* の機能を必ずしも一つに限ることは出来ないだろう。すなわち神経の成熟に関与している可能性は依然として有る。

もう一つ考えなければならない点のは、*N-myc* 遺伝子が発現しているからといってそれが機能しているのかどうかということである。第2章に示したように、Stage 7という発生の極めて早い時期からニワトリの *N-myc* は発現していた。また Downs らによって、マウス 6.5~8.5 日胚（ニワトリの Stage 7 は 7 日胚ぐらいに相当する。）で *N-myc* が発現していることが報告されている（Downs et al. 1989）。さらに早い時期では、

胚盤胞期でN-mycタンパク質の発現が確認されている(Wakamatsu, unpublished data)。しかし、N-mycを失ったマウス胚は少なくとも10.5日胚までは外見上異常が見られない。またアフリカツメガエルでは、母性発現によって中期胞胚変遷後にN-mycが発現するものの、しばらく発現が無くなり、再び発現が観察されるようになるのは神経胚後期になってからである(Vize et al. 1990)。以上のことを考え合わせると、発生の極めて初期に発現しているN-mycは特に意味が無いのかも知れない。また、N-mycタンパク質の翻訳後の修飾による活性の調節等も考慮に入れなければならないだろう。さらに、N-mycタンパク質はおそらく他の因子と二量体を形成して機能することを考えると、そのパートナーについても考える必要があり、発現と活性との関連、そして発現と変異体の異常についての評価は慎重に行う必要があり、これからの課題の一つである。

終章

N-myc 遺伝子を含む myc 遺伝子ファミリーは、これまでその役割について様々な憶測が為されて来た。しかし、長きに渡って多くの研究者が解析を行っている（その興味は、癌との関連であったり、細胞の分化であったり様々ではあるが）にも関わらず、謎は深まるばかりであった。ところが、Max 遺伝子の発見など、近年手がかりと成るような事実が見つかり始めている。今回私が行った N-myc 遺伝子の発現に関する研究は、特に正常発生の過程での N-myc の役割について、重要な情報を与えるものと期待している。

さらには、N-myc の癌化への関与についてもヒントを与えることも期待される。N-myc 遺伝子は、腫瘍細胞が悪性化する過程で働くことが報告されているが、今回示した N-myc の細胞間相互作用への関与の可能性は、悪性化した癌細胞の転移能や、侵潤性を説明することが出来るかも知れない。つまり正常での機能を知ることで、異常が起きたときの働きを理解することも出来ることが期待されるのである。

また、N-myc 遺伝子を起点とした細胞分化における遺伝子発現調節のカスケードの解析にも、今回の私の解析が役に立つであろう。今回は、他の遺伝子の発現パターンとの比較については多く触れなかったが、RAR β による発現抑制の可能性や、細胞接着因子との関連などについて述べた。今後 N-myc 遺伝子によって調節を受けている因子の候補が上がった場合にも、その真偽を検討する上で N-myc の発現の特異性の観察や機能の推測の情報が意味を持つだろう。

さらに、N-myc タンパク質が細胞質で機能するかもしれないことも示した。これまでの N-myc の研究は、特異抗体の作成が困難であったことも手

伝って mRNA の解析がほとんどであった。しかし、N-myc タンパク質がどのような状態にあるのかを見極めなければ、正しい理解が得られないことが示せたと思う。このことは、N-myc 遺伝子に限らずどのような遺伝子の解析をする場合にも言えることで、現在の遺伝子研究に一つの問題を提起したのではあるまいか。

以上、今回の私の研究の成果の持つであろう意義について述べたわけであるが、N-myc の研究はまさしく進み始めたところであり、まして発生という複雑でしかし興味深い現象を理解するためには、今後多くの研究努力が必要である（だからこそやりがいもあるのだが）といえよう。

材料と方法

(1) ニワトリの発生 Stage の特定

Humburger & Hamilton による発生段階表 (図 6-2, Humburger and Hamilton, 1951) に基づいて、発生 Stage を決めた。

(2) 組織学的手法による解析

取りだした組織または胚をハンクス生理塩類溶液で洗った。ブアン固定液で数時間固定し、その後 50%、70%、90%、100% のエタノールに各 15 分ずつ浸して脱水した。さらに 100% エタノールに 15 分間浸した後、エタノール：ブタノール = 4 : 1、3 : 2、2 : 3、1 : 4 の中に室温で各 15 分間浸し、更に 100% ブタノールに 15 分間 2 回浸した。60℃ でブタノール-パラフィン = 1 : 1 に 1 時間、パラフィンに 1 時間浸した後、更にパラフィンに 2 時間浸して十分浸透させた。そして、あらかじめろ過しておいたパラフィンに抱埋し、4℃ で保存した。ミクロトームで 5 μ m の厚さに薄切し、卵白でコートしたスライドガラスに伸展し、45℃ で十分乾かした。そしてパラフィンを除くためにキシレンに 5 分間、計 3 回浸し、100% エタノールに 5 分間、3 回浸して脱水した。マイヤーの酸性ヘマラウンで 1-2 分染色した後、一晩水で洗った。1% エオシン溶液に 2 分間浸し、70%、90%、100% エタノールで手早く脱水した。キシレンに 5 分間 2 回浸した後、オイキット (O. Kindler) で封入、顕微鏡観察した。アルシアンブルー染色を併用する場合には、ヘマラウン染色の前に、以下の操作を行った。脱パラフィン

後、水洗した切片を3%酢酸に2分間浸した。1%アルシアンブルー水溶液に一晩浸し、水洗した。0.3%炭酸ナトリウム水溶液に30分浸して色素を不溶性にした後、ヘマラウン染色に移行した。

(3) *in situ*ハイブリダイゼーション用のプローブの作成 (Hogan et al. 1986, Wakamatsu and Kondoh, 1990)

N-mycのmRNAの検出にはエクソン1全長とエクソン2の一部を含むcDNAのC1クローン約450bpを用いた (Sawai et al. 1990)。このC1クローンをプラスミドベクターpIB176のT7プロモーターの下流にサブクローニングしたものを鋳型として使用した。1.5 μ gの鋳型プラスミドDNAを挿入配列のすぐ下流で制限酵素AatIにより切断し、直鎖状にした。フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を経て、DNAペレットを10 μ lの滅菌水に溶解した。そこに4 μ lの5倍RNAポリメラーゼバッファー (200mM Tris·HCl (pH 8.0)、30mM 塩化マグネシウム、10mM スペルミジン)、1 μ lの200mM DTT水溶液、1 μ lの10mM ATP、CTP、GTP水溶液、2 μ lのRNaseインヒビター (タカラ; 20ユニット)、2 μ lのT7 RNAポリメラーゼ (トウヨウボウ; 20ユニット)、35S標識UTP (200 μ Ci)を混合して、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温した。さらに20ユニットのT7 RNAポリメラーゼを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温した。175 μ lの反応停止液 (40 μ lの1M 酢酸ナトリウム、4 μ lの0.5M EDTA、2 μ lの10% SDS、9 μ lの200mM DTT、120 μ lの滅菌水を混合して作製)を加え、フェノール-クロロホルム処理後、酢酸アンモニアを使用したエタノール沈澱を行なった。回収したDNA-RNAペレットは10 μ lの20mM DTT水溶液に溶解し、2 μ lの10倍DNaseバッファー (500mM Tris·HCl (pH 7.6)、100mM 塩化マグネシウム)、2 μ lのRNase

インヒビター、 $2\mu\text{l}$ のRNaseフリーDNase（ベーリンガー； $23\text{ユニット}/\mu\text{l}$ ）、 $4\mu\text{l}$ の滅菌水と混合した。 37°C で20分間保温し、前述の反応停止液を $175\mu\text{l}$ 加え、さらにキャリアーとして $2\mu\text{l}$ の酵母tRNA（ $10\text{mg}/\text{ml}$ ）を加えた。フェノール-クロロホルム抽出、酢酸アンモニウムを使ったエタノール沈澱を順次行なった。そして、長さを100bp程度にするために以下の操作を行なった。回収したRNAペレットを $5\mu\text{l}$ の 10mM DTTに溶解した。さらに $5\mu\text{l}$ の 200mM DTT、 $90\mu\text{l}$ の 44mM 炭酸水素ナトリウム、 66mM 炭酸ナトリウム水溶液を加えた。 60°C で50分間保温した後、中和のために 1M 酢酸ナトリウム $12\mu\text{l}$ 、 5% 酢酸 $12\mu\text{l}$ 、 200mM DTT $1\mu\text{l}$ を、そしてさらに酵母tRNA $2\mu\text{l}$ を順次加えた。酢酸ナトリウムを用いたエタノール沈澱を行ない、 -20°C で保存した。

(4) *in situ*ハイブリダイゼーション (Wakamatsu and Kondoh, 1990)

卵から取り出した胚または組織を、氷上でハックス生理塩類溶液で洗い、更に1倍PBS（ 130mM 塩化ナトリウム、 7mM リン酸水素ナトリウム、 3mM リン酸二水素ナトリウム）で洗った。そして4%のパラホルムアルデヒドを含む1倍のPBSに浸し、一晩固定した。組織学用切片と同様にして脱水から処理、切片まで行い、1%ゼラチン-1%クロムミョウバンでコートしたスライドガラスに伸展した。 45°C で一晩乾燥後、組織学切片と同様にして脱パラフィン、脱水した。風乾した切片を0.2Nの塩酸で20分間処理した後、滅菌水で5分間洗った。次に、あらかじめ 37°C に保温しておいたプロテナーゼK反応液（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテナーゼK、 100mM Tris-HCl（pH 8.0）、 50mM EDTA）中で0-20分間処理した。 $2\text{mg}/\text{ml}$ のグリシンを含む1倍のPBSに15分間浸した後、1倍のPBSで5分間洗った。後固定のために、前述のパラホルムアルデヒド溶液に20分

間浸した。1 倍の P B S で 3 分間ずつ 2 回、さらに滅菌水で洗った。そして、直前に作製したアセチル化溶液（滅菌水 4 0 0 m l にトリエタノールアミン 6 m l、1 0 N 塩酸 1 m l、無水酢酸 1 m l を混合して作る。）中で 1 5 分間激しく攪拌した。5 分間滅菌水で洗った後、7 0 %、9 0 %、1 0 0 % エタノールに各 5 分間浸して脱水し、風乾した。ハイブリダイゼーションバッファー（5 0 % ホルムアミド、1 倍デンハート溶液、2 倍 S S C、1 0 m M E D T A、1 0 % 硫酸デキストラン、5 0 0 μ g / m l 酵母 t R N A、5 0 0 μ g / m l サケ精巢 D N A、適当量の R N A プローブ）を 1 枚のスライドグラス当り 7 0 μ l 滴下し、2 5 m m \times 5 0 m m の乾熱滅菌したカバーグラスをかけた。そして、乾燥に気をつけながら 5 0 $^{\circ}$ C で約 2 0 時間保温した。4 2 $^{\circ}$ C の 2 倍 S S C に 3 0 分以上浸してカバーグラスの外れるのを待ち、5 0 $^{\circ}$ C の 0. 1 倍 S S C で 3 0 分間洗った。3 7 $^{\circ}$ C の N T E 溶液に浸した後、2 0 μ g / m l R N a s e A、1 ユニット / m l R N a s e T 1 を含む N T E 溶液で処理した。3 7 $^{\circ}$ C の N T E 溶液に 1 5 分間浸して洗い、更に 0. 1 倍 S S C、1 0 m M D T T、2 0 % ホルムアミド溶液に浸して一晚洗った。0. 1 倍 S S C で洗って D T T を除いた後、7 0 %、9 0 %、1 0 0 % エタノールに各 5 分間ずつ浸して脱水し、風乾した。次に、暗黒下で 4 5 $^{\circ}$ C で溶かした X 線用乳剤（コダック；N T B 2）と水を 1 : 1 で混合し、スライドグラスを浸した。ゆっくりと引き上げ、シリカゲルの入った暗箱の中で乾燥させて 4 $^{\circ}$ C で 4 日 - 3 週間感光させた。現像、定着、水洗し、7 0 %、9 0 %、1 0 0 % エタノールに各 5 分間浸して脱水した。更にキシレンに 5 分間 3 回浸し、オイキットで封入した。できたプレパラートは顕微鏡（アキシオプラン）で位相差、暗視野照明下で観察、写真撮影した。

（5）抗体の作成

抗体の作成、精製はおおむね Antibodies A Laboratory Manual (Harlow and

lane, 1988) に基づいて行った。合成した2種類のポリペプチドCN12、CN32をヘモシアニンに結合させたものを抗原として、それぞれをアジュバンドとともにウサギに免疫した。採血した血液は37℃で1時間保温した後、遠心して血餅を取り除いて抗血清とした。

作成した抗CN32抗血清は抗原を用いたアフィニティーカラムで精製した()。CNBr-Activated Sepharose 4B (ファルマシア) にCN32ポリペプチドをカップリングし、このカラム2mlに対して5mlの抗血清を反応させた。結合した抗体は、100mMのグリシン水溶液(pH2.5)で溶出し、硫酸沈澱で濃縮した。そして1倍のPBSで透析して冷蔵保存した。

(6) 大腸菌によるN-mycタンパク質の産生

ニワトリN-myc遺伝子から、タンパク質をコードしている部分を含むエクソン3の一部であるDraI断片を切り出し、発現ベクターpET3aのT7プロモーターの下流に順向きに挿入した。そしてこの遺伝子は大腸菌BL21株に形質転換した。形質転換株を培養してIPTGで誘導後、集菌してSDS-PAGEサンプルバッファー(50mM Tris HCl pH6.5、2% SDS、2% 2-mercaptoethanol、0.1% BPB)を加え、100℃で熱してタンパク質を可溶化してウェスタンブロッティング用のサンプルとした。

(7) 組織からの核、細胞質の分離と免疫沈降(Kato et al, 1990)

6日胚、10日胚から神経性網膜、14日胚から肝臓を単離し、氷冷したリシスバッファー(10mM Tris HCl pH7.5、10mM NaCl、3mM MgCl₂、0.5% Triton X-100、2mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))を加えてダウンス型のホモゲナイザーでホモゲナイズした。遠心して、上清は細胞質フラクションとし、沈澱した核はSDSサンプルバッファー(50mM Tris HCl pH6.5、2% SDS、2% 2-mercaptoethanol、1mM PMSF)に懸濁した。この時、細胞質フラクションに核

が混入していないことを確認し、核懸濁液中の核の数を数えた。核フラクションはこの後ソニケートした。この後、等量のNP40溶液(20mM Tris HCl pH 7.6、300mM NaCl、4% NP40)と混合し、抗CN32抗体を200倍希釈になるように加え、室温で4-5時間反応させた。そしてProteinA-Sepharose CL4Bビーズ(ファルマシア)を加え、一晚4℃でゆっくりと混合した。遠心でビーズを回収し、SDS-PAGEサンプルバッファーを加えて100℃で熱した。そして可溶化した蛋白をウェスタンブロッティング用のサンプルとした。

(8) ウェスタンブロッティング (Kato et al, 1990)

大腸菌の可溶化したサンプルや免疫沈降で濃縮した組織からのタンパク質、網膜の核、細胞質フラクションの一部は10% SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロースメンブレンに電氣的にプロットした。3%スキムミルクを含むTTBS (100mM Tris HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1%Tween 20)で室温30分ブロッキングし、一次抗体を0.5%スキムミルクを含むTTBSで希釈して一晚4℃で反応させた。一次抗体の希釈は、抗CN32抗血清、精製抗CN32抗体とも200倍、抗ニューロフィラメント200kDa (BioMedTek)は500倍で用いた。そしてTTBSで洗浄し、大腸菌のサンプルと抗ニューロフィラメントで染色する細胞質、核フラクションについてはビオチン化した抗ウサギロバ抗体(アマシャム)を500倍に希釈して反応させた。そして、洗浄後ストレプトアビジン結合horse radish peroxidase(HRP)(アマシャム)と反応させた。さらに洗浄した後、0.1Mの酢酸ナトリウム(pH 5.2)にaminoethyl carbazoleと過酸化水素水を加えた反応液にメンブレンを浸して発色させた。抗CN32抗体で免疫沈降したサンプルについては、125IラベルのProtein A(アマシャム)を1000倍希釈して反応させ、オートラジオグラフィーで検出した。

(9) ESTO、L929細胞株の培養と遺伝子導入

ESTO細胞の培養は、一般法に基づいて10%牛胎児血清を含むDulbecco-Modified Eagle's Medium (DMEM)で行った。L929は、10%馬血清を含むDMEMで培養した。

ESTO細胞への遺伝子導入には、ニワトリN-mycのコード領域を全て含むcDNAをpCDM8ベクターのサイトメガロウイルスのプロモーターの下流に順向きに挿入したpCDM8-C23と、 β -ガラクトシダーゼの発現ベクターpMiWZ (Suemori et al. 1990)を用いた。導入法は、一般的なりン酸カルシウム共沈殿のトランスフェクションを用いた。

(10) 神経冠、脊髄神経節細胞の培養

神経冠細胞の培養は、Sieber-Blumらの方法に従って行った (Sieber-Blum, 1991)。ふ卵2日 (Stage 14) のウズラ胚から神経管をタングステン針で単離し、コラーゲンコートしたディッシュ上で2日間培養した。そして、這い出してきた神経冠細胞を別のディッシュにまき直してさらに培養した。

脊髄神経節は、9日胚のニワトリ胚から単離して、10%馬血清を含むDMEMにL929細胞株の培養上清を加えた培地で培養した (Acheson et al. 1991)。

(11) 抗体染色 (Kato et al. 1991)

培養細胞は3.5%パラホルムアルデヒド/ハンクス生理塩類溶液で室温10分間固定し、そのまま染色に用いた。胚は、ハンクスで洗った後、培養細胞に用いたのと同じ固定液で4℃でサンプルの大きさに合わせて数時間固定した。そして、15%、20%、25%のシュクロースを含むハンクスに各数時間ずつ浸して密度を高くした後、OCTコンパウンド (Miles scientific) に埋め、

凍結した。4-5 μ mの厚さに薄切し、TTBSで2回洗って染色に用いた。以下の実験操作は、組織切片、培養細胞とも同様の方法で行った。まず、3%のBovine Serum Albumin (BSA)を含むTTBSで室温30分間ブロッキングした。そして3%BSA-TTBSで一次抗体を希釈して、4℃一晩反応させた。ポリクローナル抗体の抗CN32抗体は200倍、抗CN12抗血清は100倍、抗GFAP (Transformation Research) は300倍で、ウサギモノクローナル抗体の抗ニューロフィラメント160 kDa (BioMakor)、抗ビンキュリン (BioMakor)、抗 β -ガラクトシダーゼ (Boehringer Mannheim)、HNK-1 (= antiLeu 7) (Becton Dickinson) は50倍で使用した。TTBSで洗浄後、ビオチン化した抗ウサギロバ抗体を100倍希釈で室温2時間反応させた。モノクローナル抗体でも染色する場合は、ローダミン結合抗マウスヤギ抗体 (カッペル) をやはり100倍希釈で加えた。TTBSで洗浄後、ストレプトアビジン結合FITC (アマシャム) を100倍希釈で室温1時間反応させた。TTBSで洗浄し、200 μ g/mlの4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で5分間核を染色した。さらにTTBSで洗浄した後、p-phenylenediamineを含むグリセロールで封入した。そして蛍光顕微鏡 (アキシオプラン; Zeiss) と共焦点レーザー顕微鏡 (LSM; Zeiss) で観察した。

(12) ニワトリ胚の肢芽の操作

肢芽へのRAの投与は、Tickleらの方法で行った (Tickle et al, 1989)。0、1、10 mg/ml DMSOの濃度のRAをAG-1イオン交換ビーズ (ファルマシア) に浸し、タングステン針でStage 18のニワトリ胚の前肢芽前方に部分的に切れ目を入れて、そのビーズをはさんだ。そのままふ卵し、12、24時間後に*in situ*ハイブリダイゼーション用のサンプルとして固定、埋埋した。一部はそのまま6日間ふ卵し、5%トリクロロ酢酸で一晩固

定した。0.5%アルシアングリーン/3%酢酸で2日間軟骨を染色して、1%塩酸-70%メタノールで数時間弁色、100%メタノールで脱水、サリチル酸メチルで透徹した。そして透過光で実体顕微鏡下で観察した。

AERは、Stage 18の前肢芽からタングステン針で完全に取り除いた。その後の処理は、RAの投与の場合と同様に行った。

図 1 - 1. 抗血清作成に用いた合成ポリペプチド CN 1 2 と CN 3 2 の場所。
ニワトリ N - m y c の 2 5 5 番目のアミノ酸からカルボキシル末端までを示し
てある。星印は上下のタンパク質のアミノ酸が同じことを表している。MN 1
4 は抗マウス N - m y c 抗体の作成に使用されたポリペプチドの配列 (Kato e
t al. 1990)。また、プラスミド p E T 3 a - C N D r a を大腸菌に形質転換
することで出来る N - m y c タンパク質の部分は、矢印で示したところからカ
ルボキシル末端までである。


```

mus-L : EIDVVTVEKRRSLDIRKPV---ITVRA-----DPLDPLDPCMLHPHISIHQQOHNYAARFPPESSCSQEGDPEPGPQEEAPEIEAPKEKEEEEEEEEE
*****
mus-N : EIDVVTVEKRRSSNNKAVTTFTITVRPKTSALGLGRAQPGELILKRCVPIHQ--HNYAAP-----
*****
hum-N : EIDVVTVEKRRSSNTKAVTTFTITVRPKNAALGPGRASSELILKRCLEPIHQ--HNYAAP-----
*****
chk-N : EIDVVTVEKRRSSN-KAVTTLTITVRPKNTTTPSVRTQNELILKRCAPIHQ--HNYAAP-----
*****
chk-c : EIDVVTLAEESESSSESSESESEHC-----KPHHSPLVLKRCVNIHQ--HNYAAP-----
*****
hum-c : EIDVVSVEKRGAPGKRSESGSPSAGGHS-----KPPHSPLVLKRCVSTHQ--HNYAAP-----
*****

```

```

                                VIII                      Basic      Helix I      Loop
mus-L : EIVSPPVGE-AP-Q-----SCHPKVSTDSEVTEKRNHNFLERKRRNDLSRFLALRDQVPTLASCSYAPVVLKSKALEY
MN14 *****
mus-N : ---SPY-VESEDAPPQKKIKSEASPRPLKSVVPKAKSLSPRNSDSEDSEERRRNHNI LERERRNDLRSSFLTLDHVPPELVKNEAAKVVLKKATEY
*****
hum-N : ---SPY-VESEDAPPQKKIKSEASPRPLKSVIPKAKSLSPRNSDSEDSEERRRNHNI LERQRRNDLRSSFLTLDHVPPELVKNEAAKVVLKKATEY
CN32 *****
chk-N : ---SPY-MESEDVPPQKKLAEV-PRPVKPMIQPKSKSSSPRNSDSEDSEERRRNHNI LERQRRNDLRSSFLTLDHVPPELVKNEAAKVVLKKATEY
*****
chk-c : ---PSTKV---EYPAAKRLKLD--GRVLKQISNNRKCSPTSSEENDKRRTHNVLERQRRNELKLSFFALRDQIPEVANNEKAPKVVLKKATEY
*****
hum-c : ---PSTRK---DYPAAKRVKLD--VRVLKQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAY
*****

```

Helix II Leucine Zipper

```

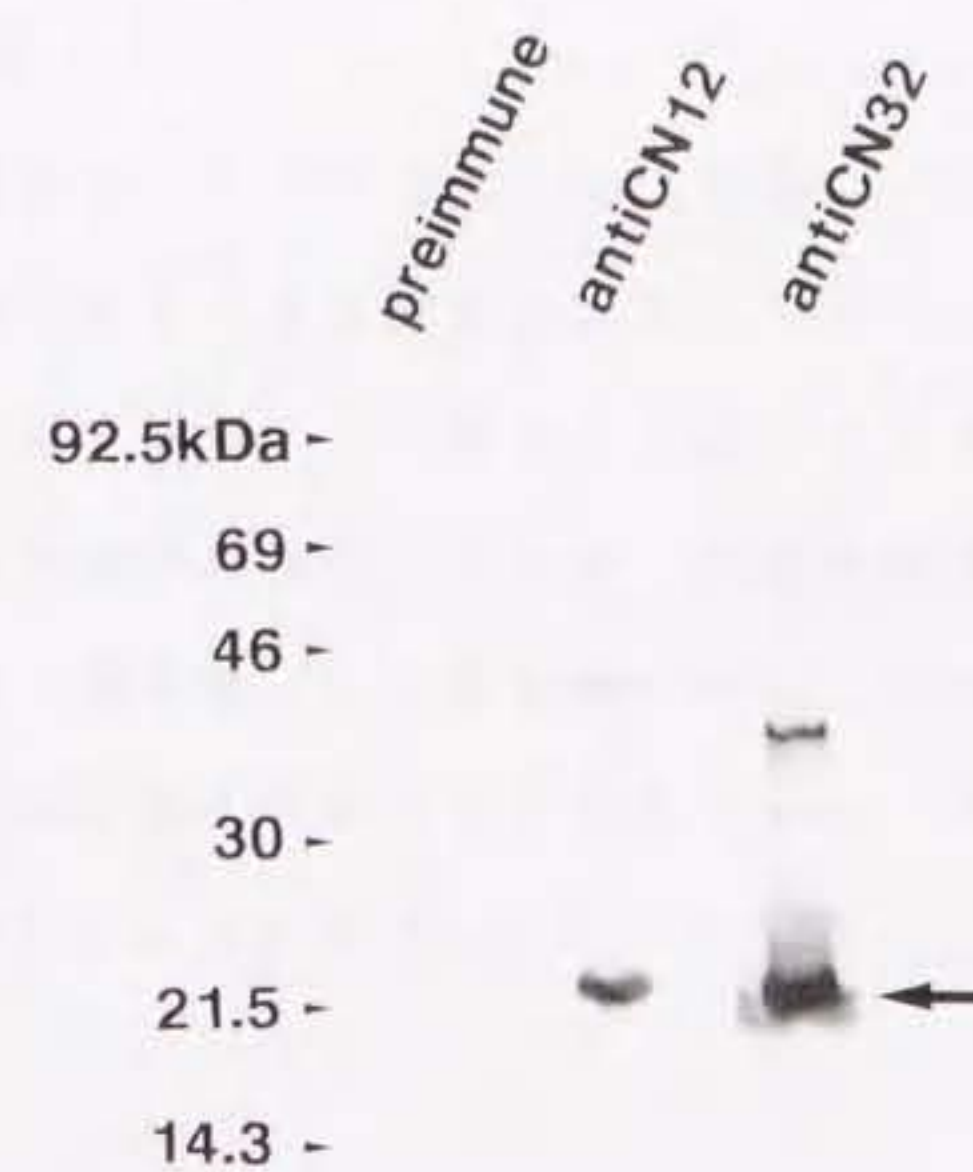
mus-L : LQALVGAEKRMATEKRNLCRNNLNKRIAYLSGY
*****
mus-N : VHALQANEHQLLLEKEKLQARQQQLLKKIEHARTC
*****
hum-N : VHSQAEEHQLLLEKEKLQARQQQLLKKIEHARTC
*****
chk-N : VHSQAEEQKLLLEKEKLQARQQQLLKKIEYKRTC(K)
*****
chk-c : VLSIQSDEHRLIAEKEQLRRRREQLKHKLEQLRNSRA
*****
hum-c : ILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA
*****

```


図1-2. (A) ニワトリN-myc遺伝子を大腸菌に発現させ、SDSポリ
アクリルアミドゲル電気泳動によって分離後、ウェスタンブロッティングを行
った。左から、CN32を免疫する前のウサギの血清、抗CN12抗血清、抗
CN32抗血清を一次抗体として用いた。矢印が約22kDaのN-mycタ
ンパク質のバンドを示している。(B) ニワトリN-myc遺伝子を組み込ん
だ発現ベクターを β ガラクトシダーゼ遺伝子と共にESTO細胞株にトランス
フェクションし、精製抗CN32抗体と抗 β -ガラクトシダーゼ抗体を用いて
染色した。左から、DAPIによる核染色、抗CN32染色、抗 β -ガラクト
シダーゼ染色を示している。白矢印は同一の細胞を指している。



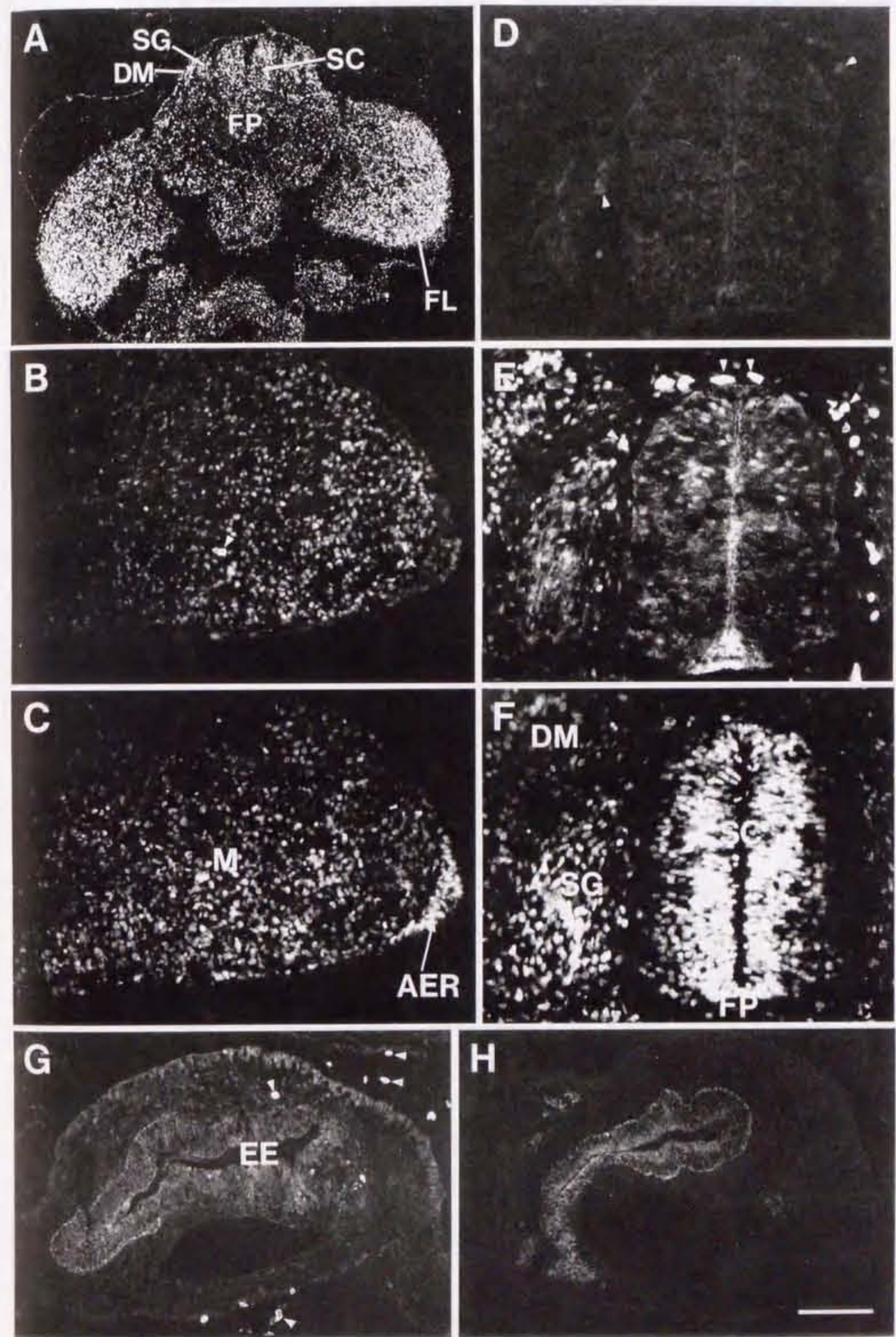
A



B



図1-3. 精製抗CN32抗体の特異性の検索。(A) 3.5日胚の横断切片の*in situ*ハイブリダイゼーション。B、E、Gは3.5日胚の横断切片に対する抗CN32抗体染色。Bは前肢芽、Eは脊髄、Gは前胃である。C、FはそれぞれB、EのDAPIによる核染色。D、HはそれぞれE、Gの近傍の切片で、予めCN32ポリペプチドで吸収した抗CN32抗体を用いて染色を行ったもの。矢じりは赤血球を指す。AER; 外胚葉性頂堤、DM; 皮筋板、EE; 内胚葉性上皮、M; 間充織、H; 肝細胞、FL; 前肢芽、FP; 底板、SC; 脊髄、SG; 脊髄神経節。白線はAで200 μ m、B、C、G、Hで100 μ m、D、E、Fで60 μ mを示す。



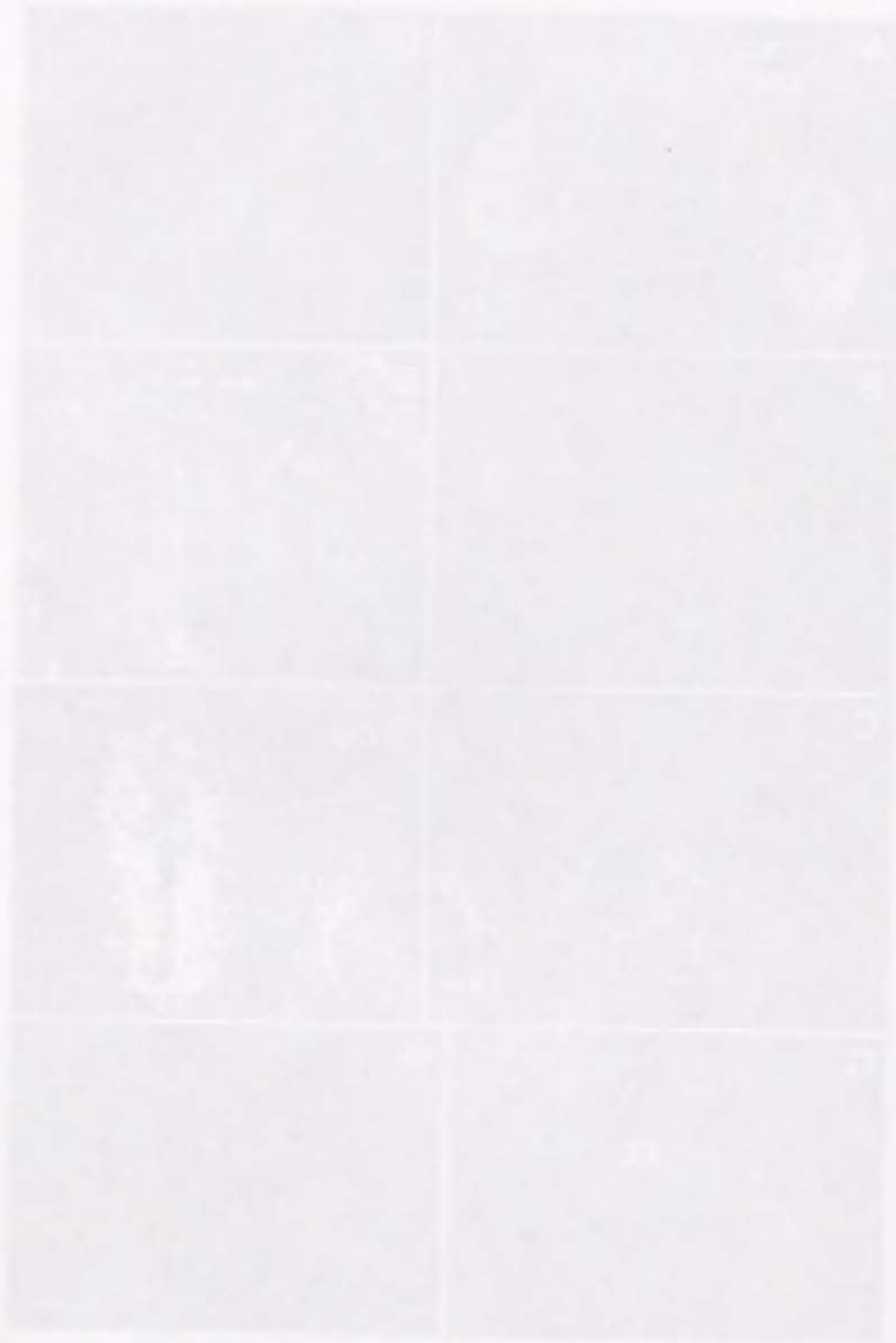
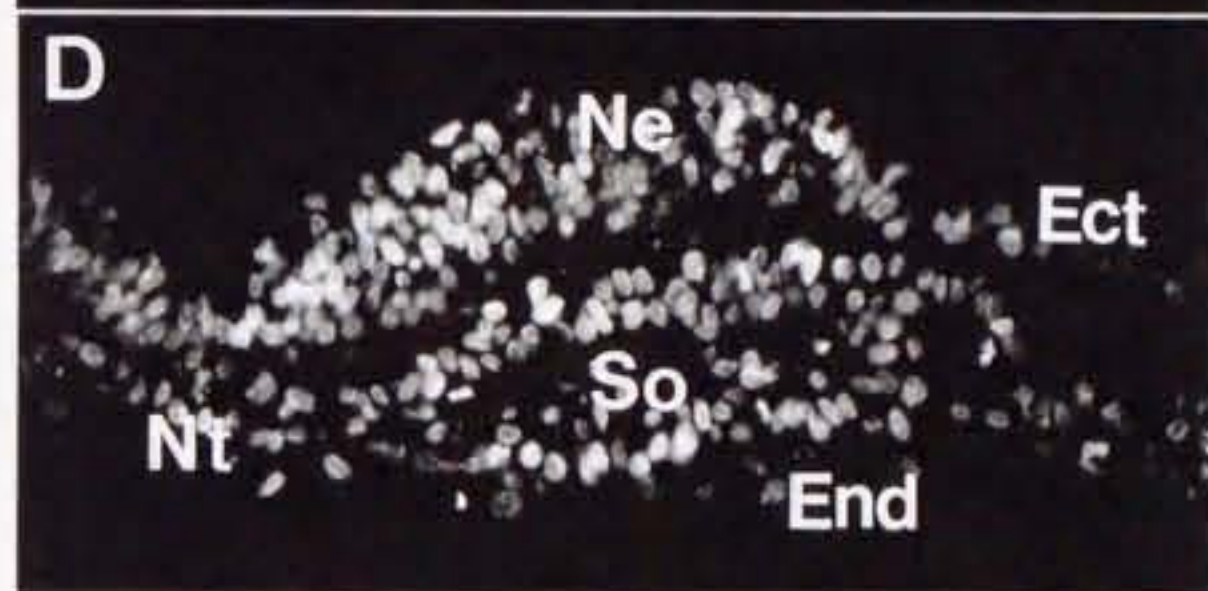
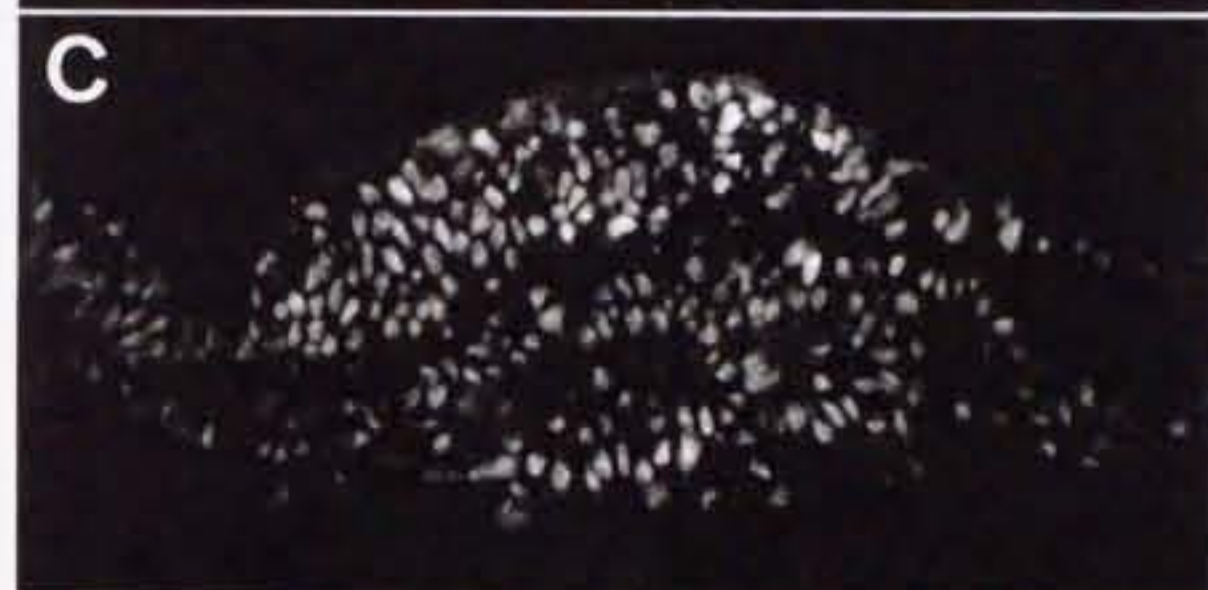
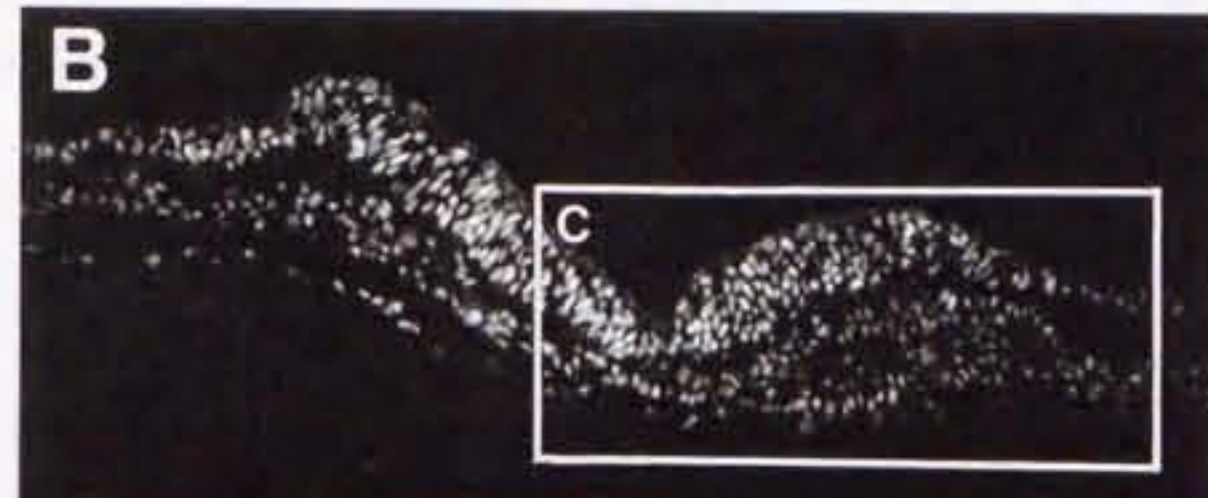


図2-1. 神経胚期でのN-mycの発現。Stage 7のニワトリ胚の横断切片を抗CN32抗体で染色した。A、B、Eは順に頭部、第一体節部、尾部の抗CN32染色を示している。CはBの枠内の拡大で、Dは同じ視野のDAPIによる核染色。矢印は体軸の方向を示す。Ect; 外胚葉、End; 内胚葉、Ne; 神経外胚葉、Nt; 脊索、PS; 原条、So; 体節。白線はA、B、Eで100 μ m、C、Dで50 μ mを表す。



Anterior



Posterior

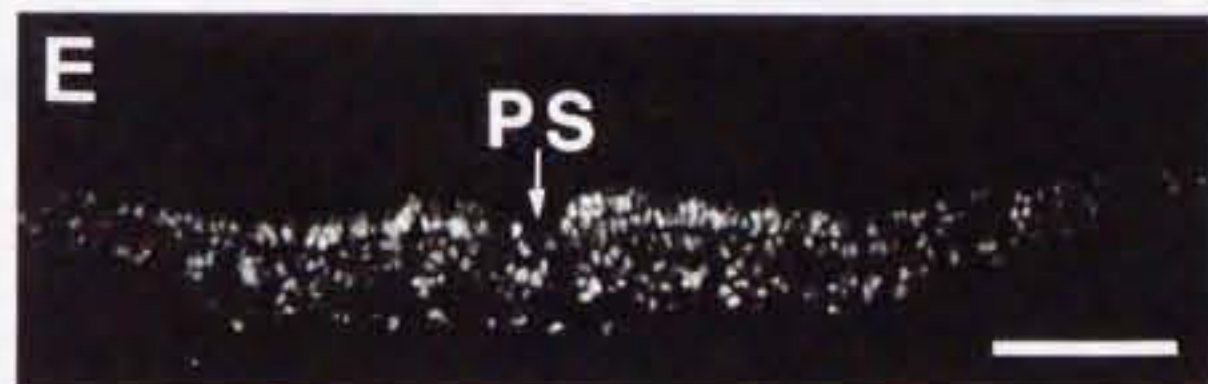


図 2 - 2. 脊髄での N - m y c タンパク質の発現。A は S t a g e 1 8 の横断切片の抗 C N 3 2 染色。B はその D A P I 像。C は S t a g e 2 1 の抗 C N 3 2 染色。D の D A P I 像との対比から解るように、腹側から進む層構造の形成にともなって、N - m y c タンパク質の分布に変化がある。前角と、外側に移動中の神経芽細胞と思われる細胞が抗 C N 3 2 で染色されている。E、F、G は S t a g e 2 9 の前角部分の拡大。抗ニューロフィラメントで染色される (E) 運動神経が N - m y c を発現している (F)。G は D A P I。H、I は S t a g e 3 1 の中心管付近の拡大。I の D A P I 像と対比してみると、神経上皮層に、N - m y c タンパク質が分布しているのが解る (H)。また、その側の一部の神経細胞にも弱い発現がみられる。N E ; 神経上皮層、V H ; 前角、W M ; 白質。白線はそれぞれ 5 0 μ m を表す。

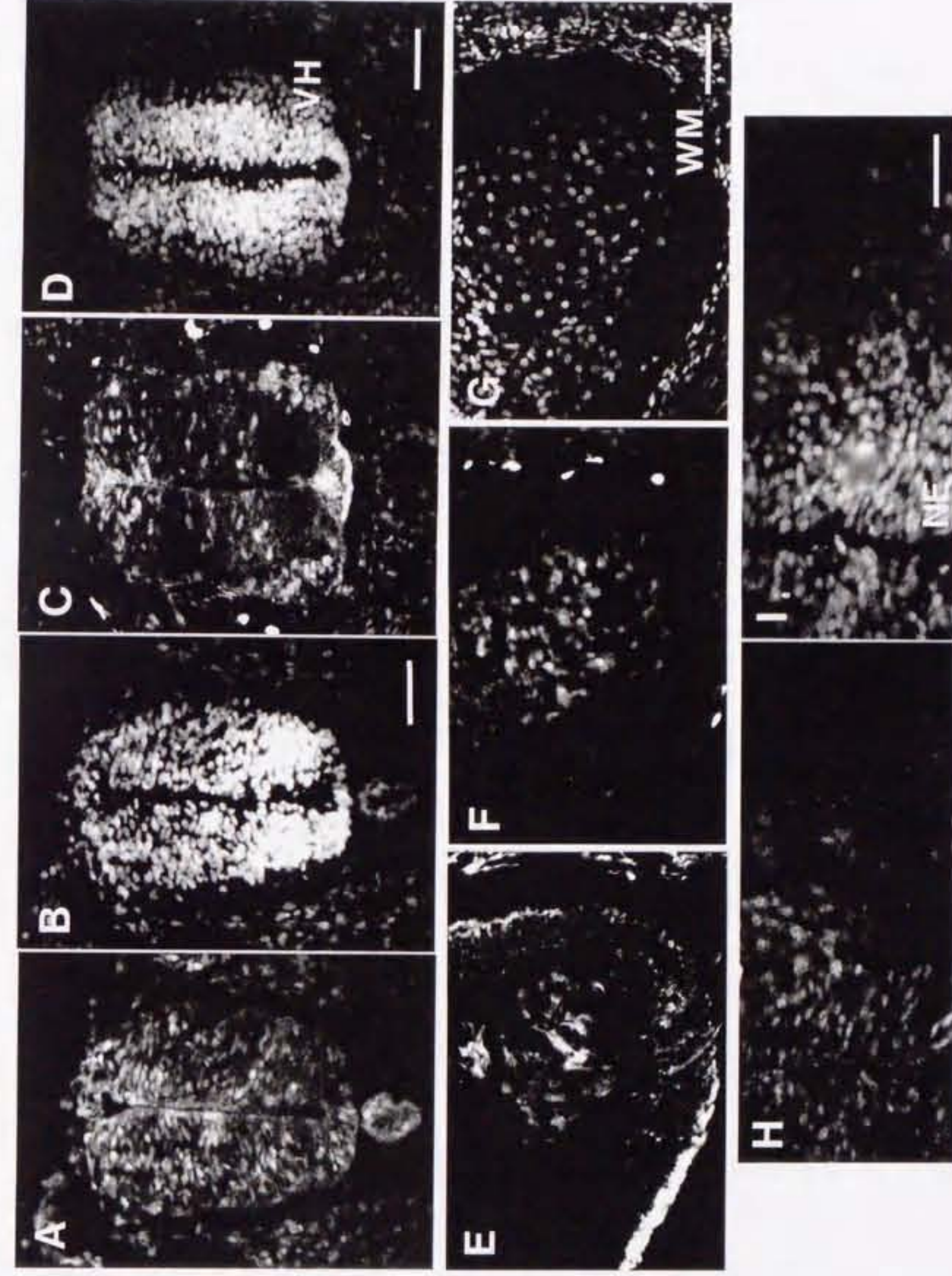


図2-3. 大脳の発生に伴う組織構築とN-mycタンパク質の発現の変化。

左上から順に、Stage 21の位相差、抗CN32、DAPI、Stage 29の抗CN32、DAPI、Stage 31の抗CN32、DAPI、Stage 38の抗CN32、DAPI、位相差。各層の対応を実線で示してある。

右は上から、Stage 42の位相差、抗CN32、DAPI、近傍の切片の抗GFAP。Stage 21から38までは同倍率だが、Stage 42については、脳室層、を拡大してあり、白線はStage 21では50 μ m、Stage 42では25 μ mを表す。Stage 42の矢印は、上衣細胞の突起を指す。Cp；皮質層、E；表皮、M；間充織、Mz；外套層、NE；神経上皮、Vz；脳室層。

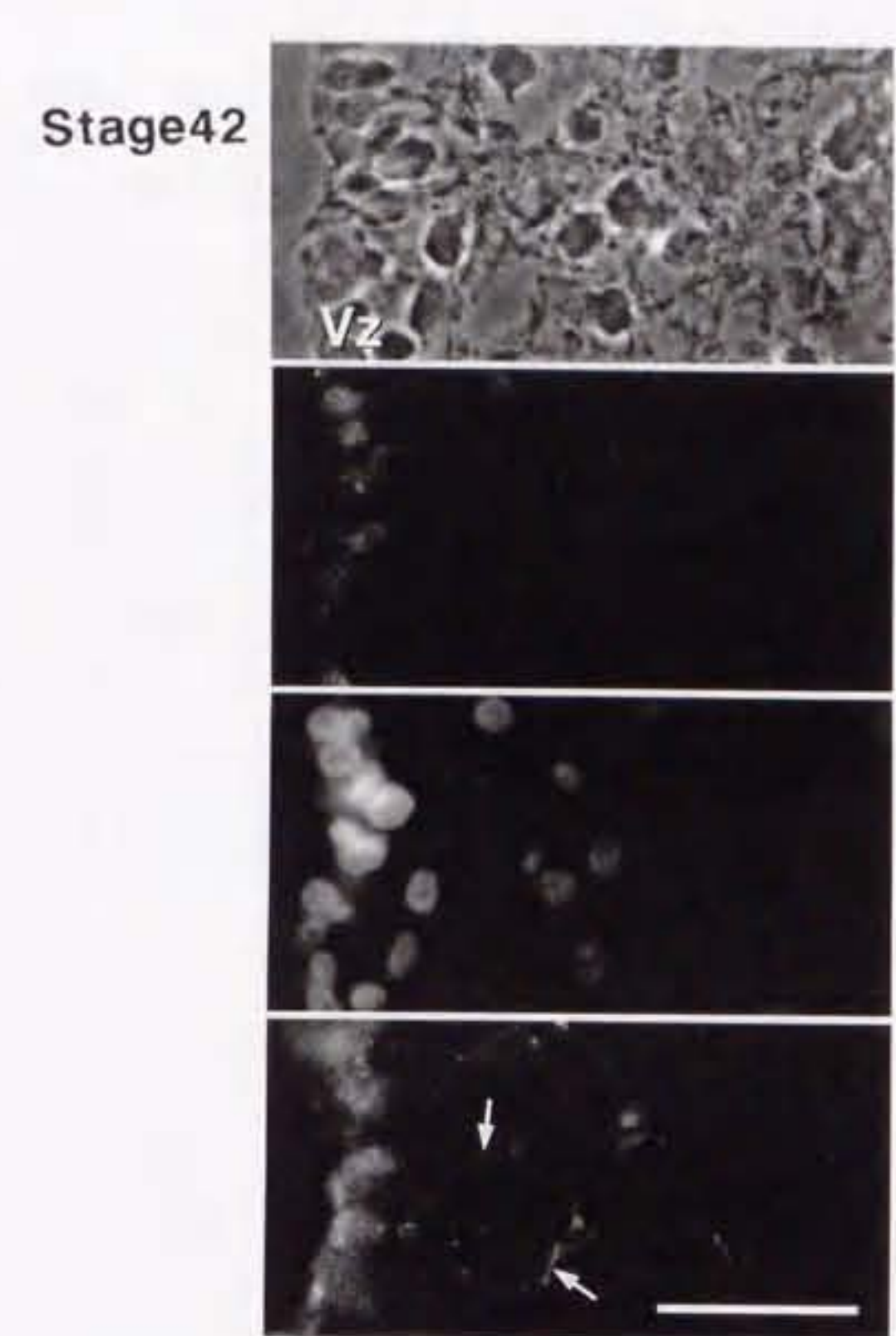
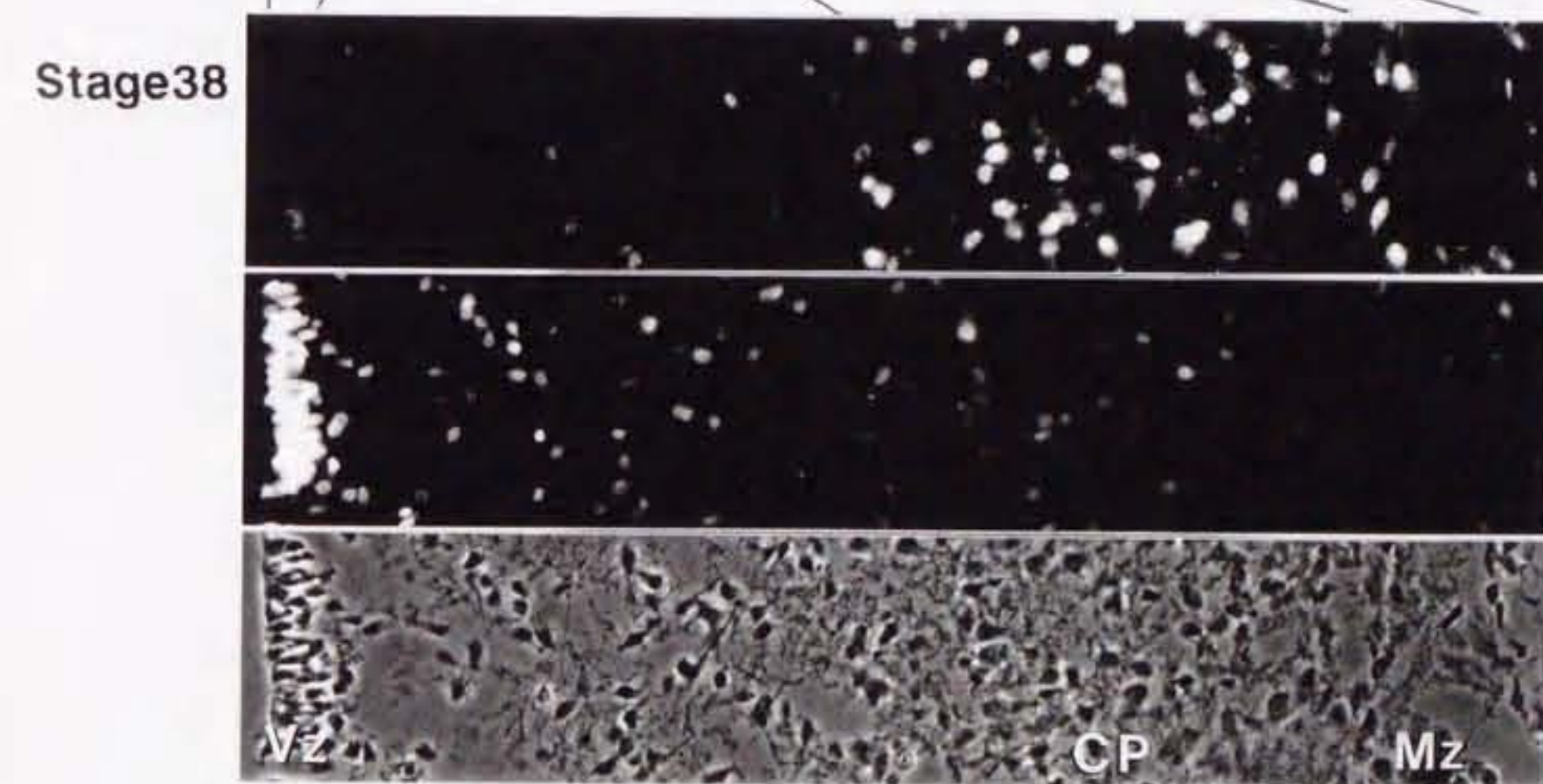
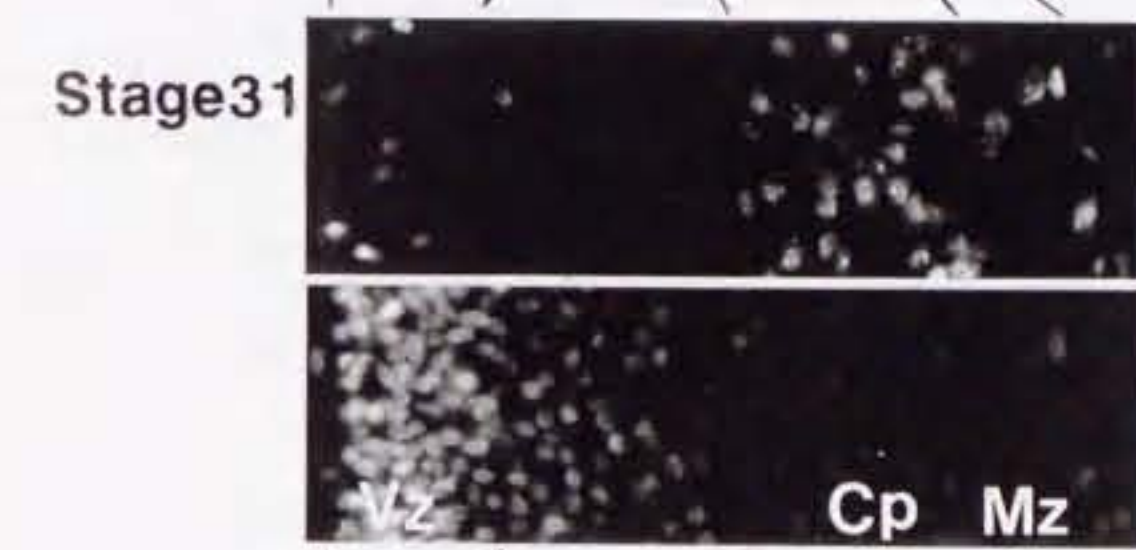
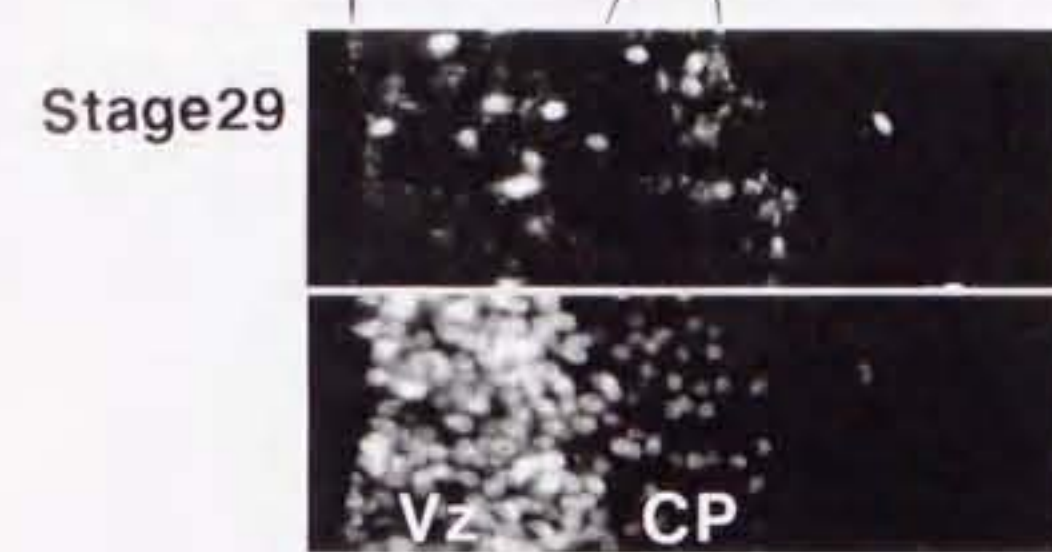
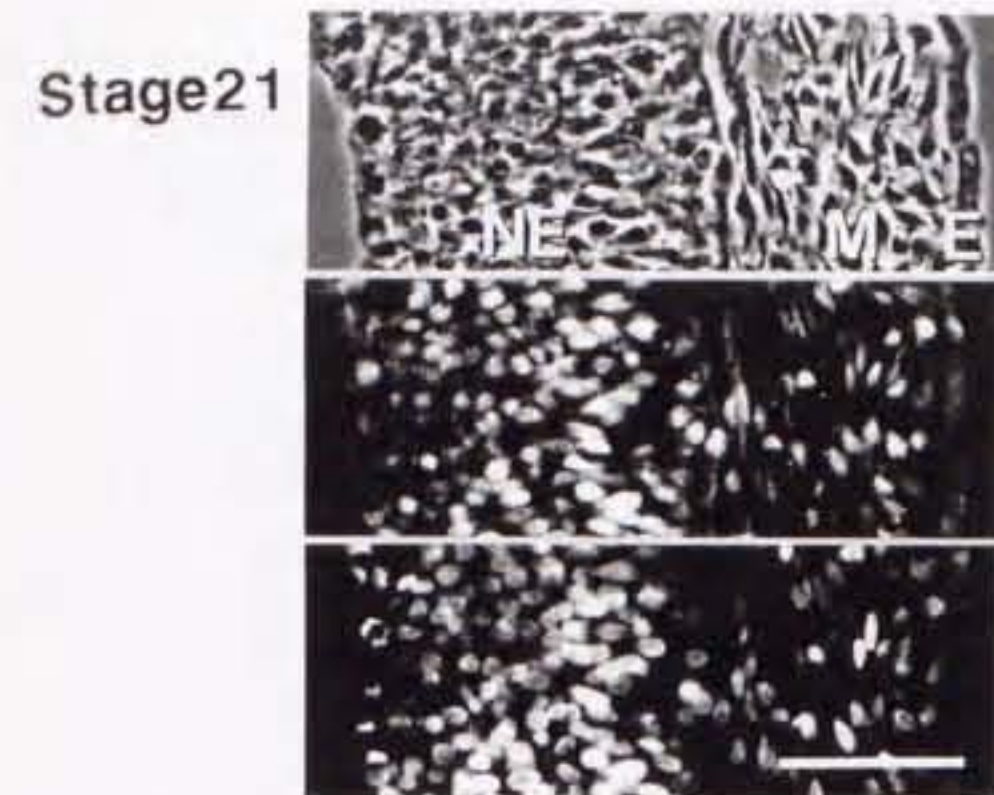


図 2 - 4. 小脳での N - m y c タンパク質の分布。S t a g e 3 8 小脳の縦断切片に対し、抗 C N 3 2 染色 (B 、 F)、抗ニューロフィラメント染色 (C 、 G)、D A P I による核染色 (A 、 E) を行った。D 、 H は位相差像。A - D は小脳葉全体を、E - H はその先端部の拡大を表している。外顆粒層の外側の部分と、内顆粒層で N - m y c の発現がみられる。矢印で示した細胞は、形態やニューロフィラメントの発現から、未成熟のプルキンエ細胞と思われる。E G L ; 外顆粒層、I G L ; 内顆粒層、P C L ; プルキンエ細胞層、W M ; 白質。白線は A ~ D で 1 0 0 μ m、E ~ H で 5 0 μ m を表す。

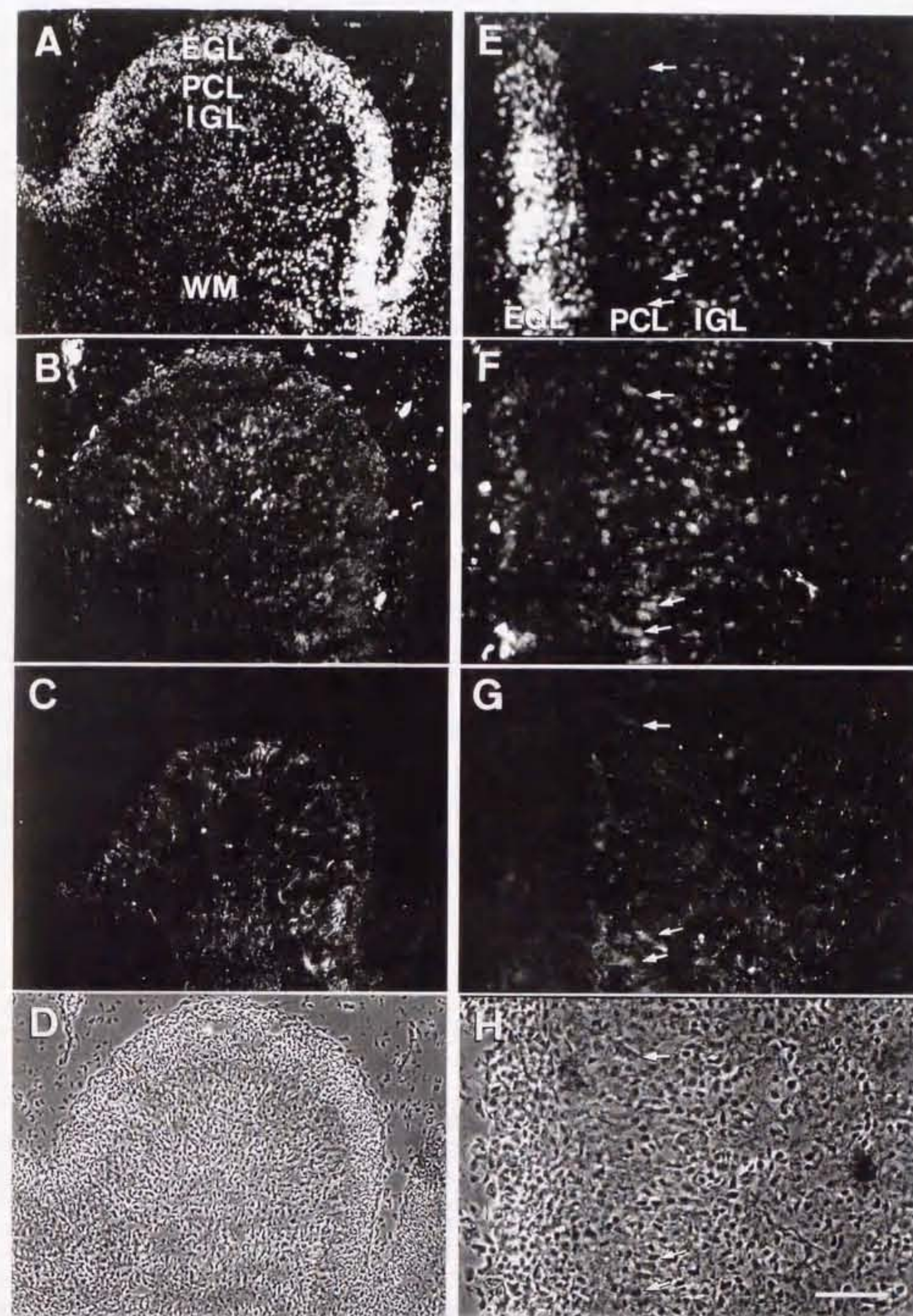


図 2-5. 体幹部神経冠とそれに由来する組織での N-myc の発現。A は Stage 14 の横断切片の抗 CN 32 染色。B は同じ視野の HNK-1 染色。移動中の神経冠細胞を示している。C は A の近傍の切片を抗ビンキュリン抗体で染色したもの。皮筋板の一部や、脊椎の外縁などと共に、神経冠細胞も良く染まっている。D は Stage 21 の交感神経節の抗 CN 32 染色。E の HNK-1 染色と対比してみると、交感神経節での N-myc の発現が弱いことが解る。なお、背側大動脈内の強く染まっている細胞は赤血球。F は Stage 29 の脊髄神経節の抗 CN 32 染色。G の DAPI 染色と比べて解るように、丸い核を持った神経細胞の核が抗 CN 32 抗体によって染まっている。背部の分化の遅れている細胞では発現が弱い。H は Stage 36 の脊髄神経節の抗 CN 32 染色で、I は同じ視野の DAPI 染色。矢印は成熟しつつある感覚神経細胞を、やじりはそれを取り巻くサテライト細胞を示している。感覚神経の細胞質が抗 CN 32 によって染色されている。J は、前胃の抗 CN 32 染色を一部拡大したもの。K は同じ視野の抗ニューロフィラメント染色。平滑筋の前駆細胞と共に、その周囲に接触している副交感神経（やじり）が N-myc を発現している。DA；背側大動脈、DM；皮筋板、NC；神経冠、Sc；硬節、SC；脊髄、SM；平滑筋前駆組織、Sym. G；交感神経節。白線は H、I で 25 μ m、それ以外は 50 μ m を表す。

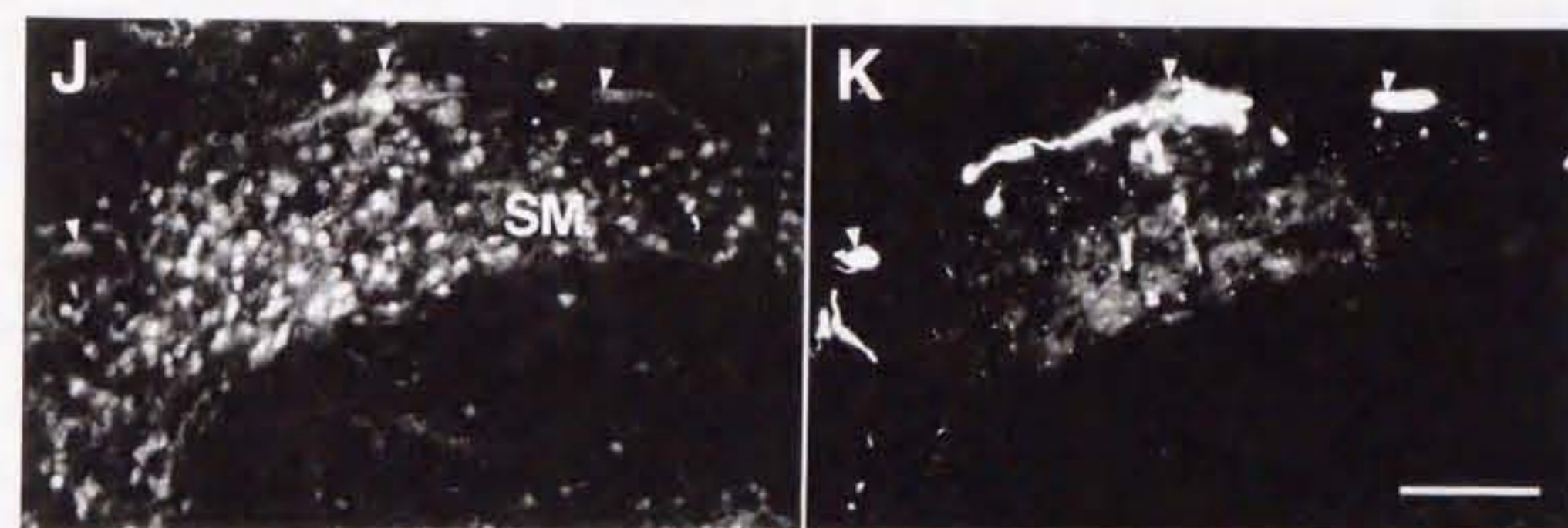
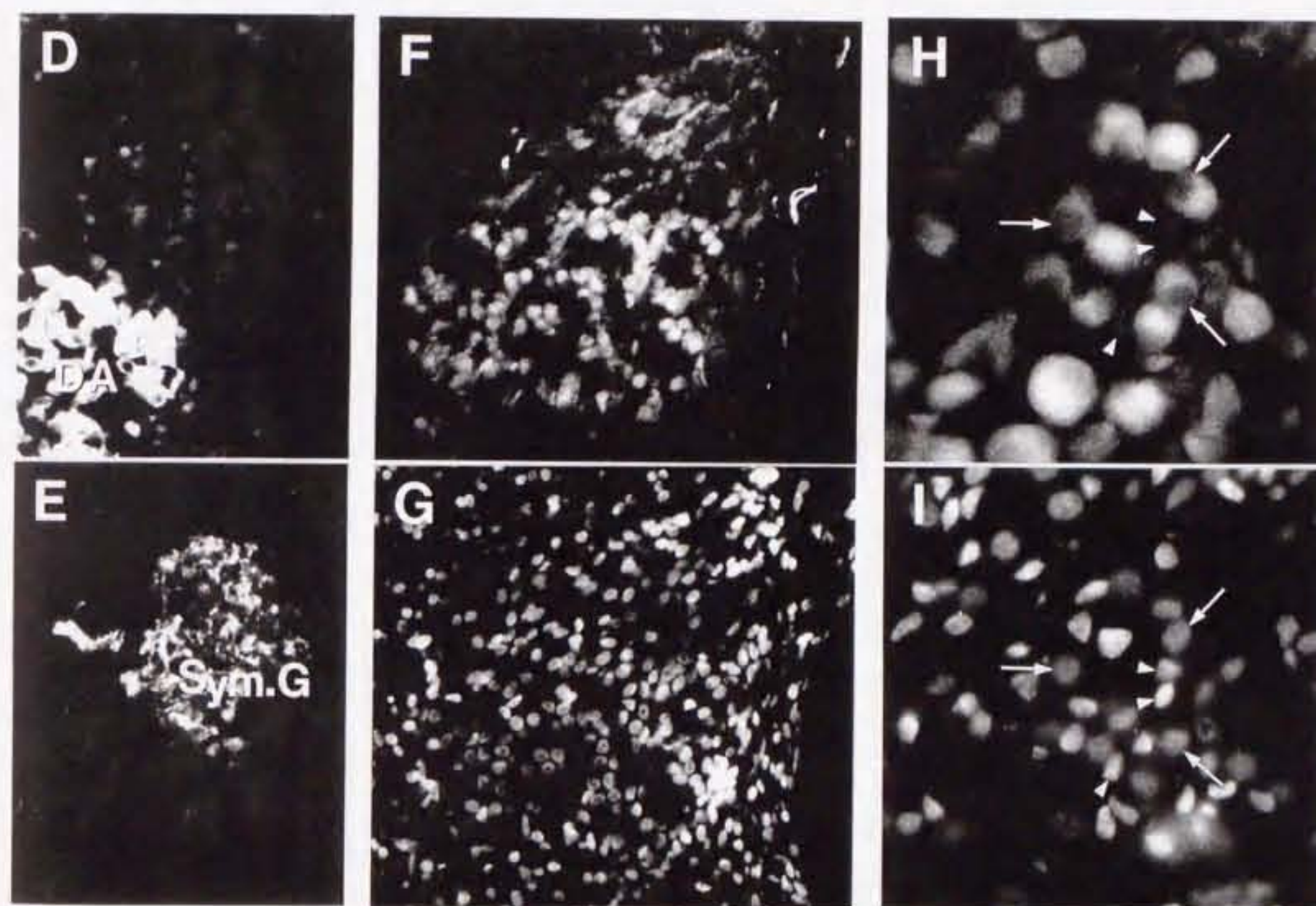
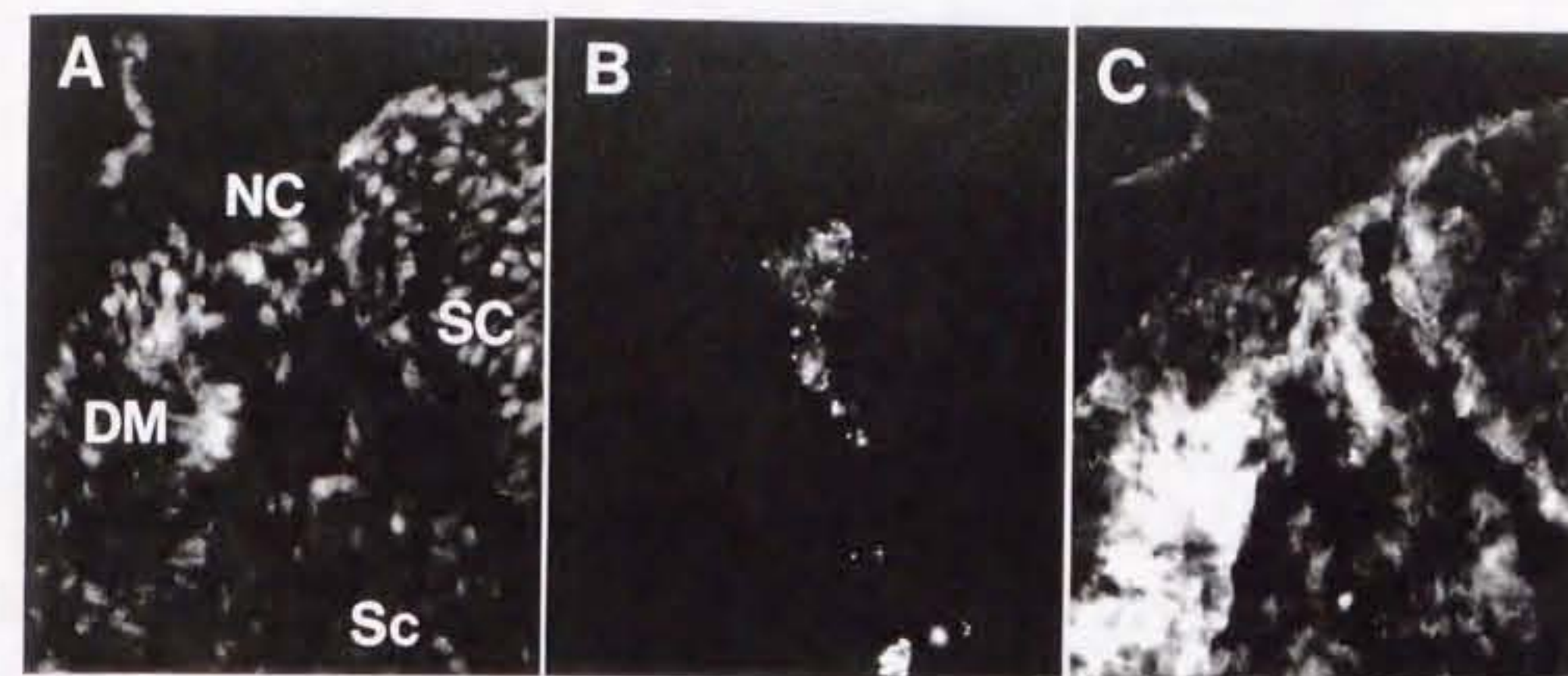
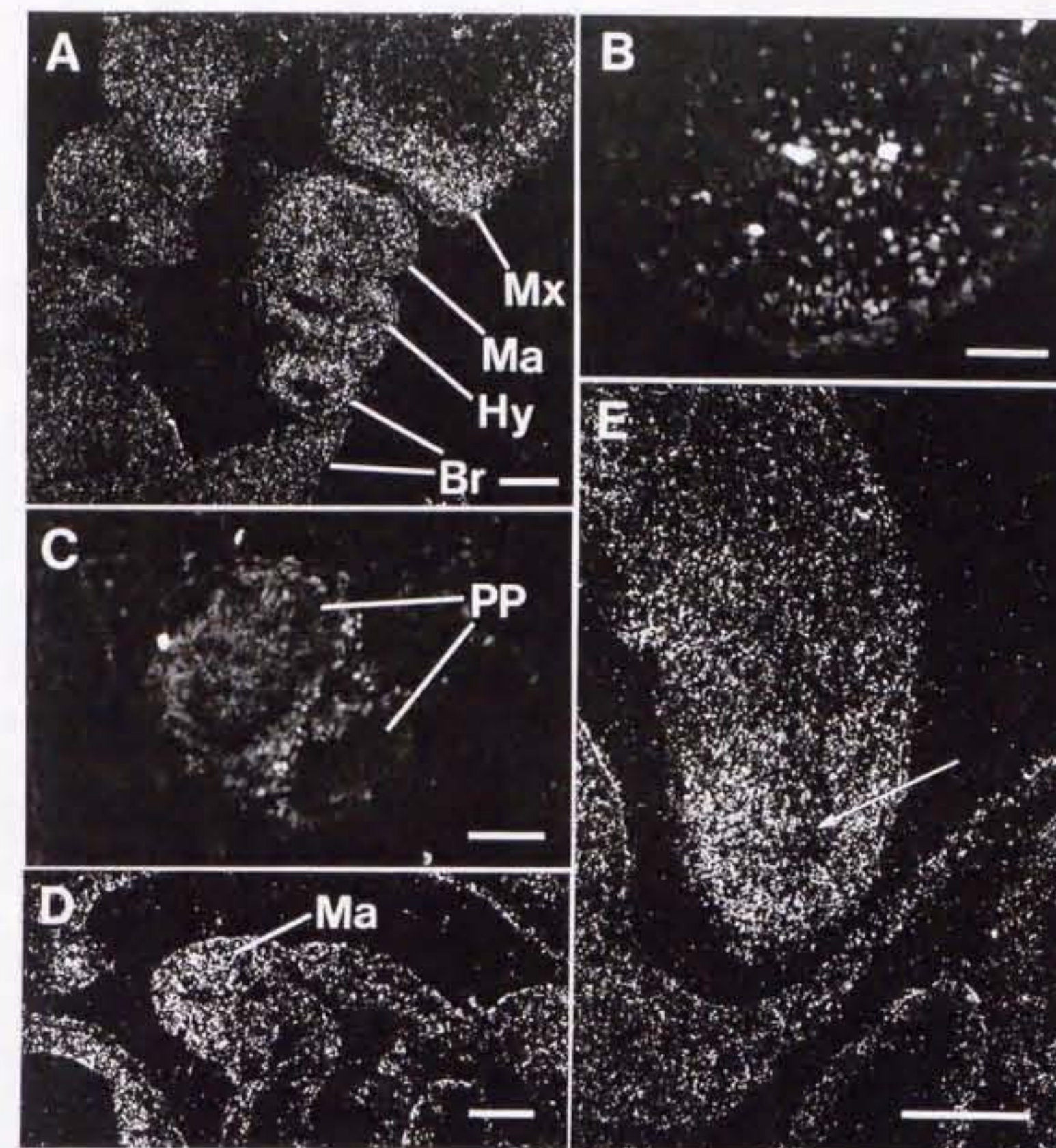


図2-6. 頭部神経冠細胞由来の組織でのN-mycの発現。A、D、Eは*in situ*ハイブリダイゼーション、B、Cは抗CN32染色を示す。AはStage 19の横断切片。BはStage 21の上顎突起の拡大で、下が先端。CはBと同じ切片の第3咽頭嚢の付近の拡大。DはStage 19の縦断切片で見た下顎弓で、左が先端。EはStage 24の上顎突起で、やはり下が先端。矢印は骨組織の分化が始まっている部分。Br; 鰓弓、Hy; 舌骨弓、Ma; 下顎弓、Mx; 上顎突起、PP; 咽頭嚢。白線は、A、D、Eで100 μ m、B、Cで50 μ mを表す。



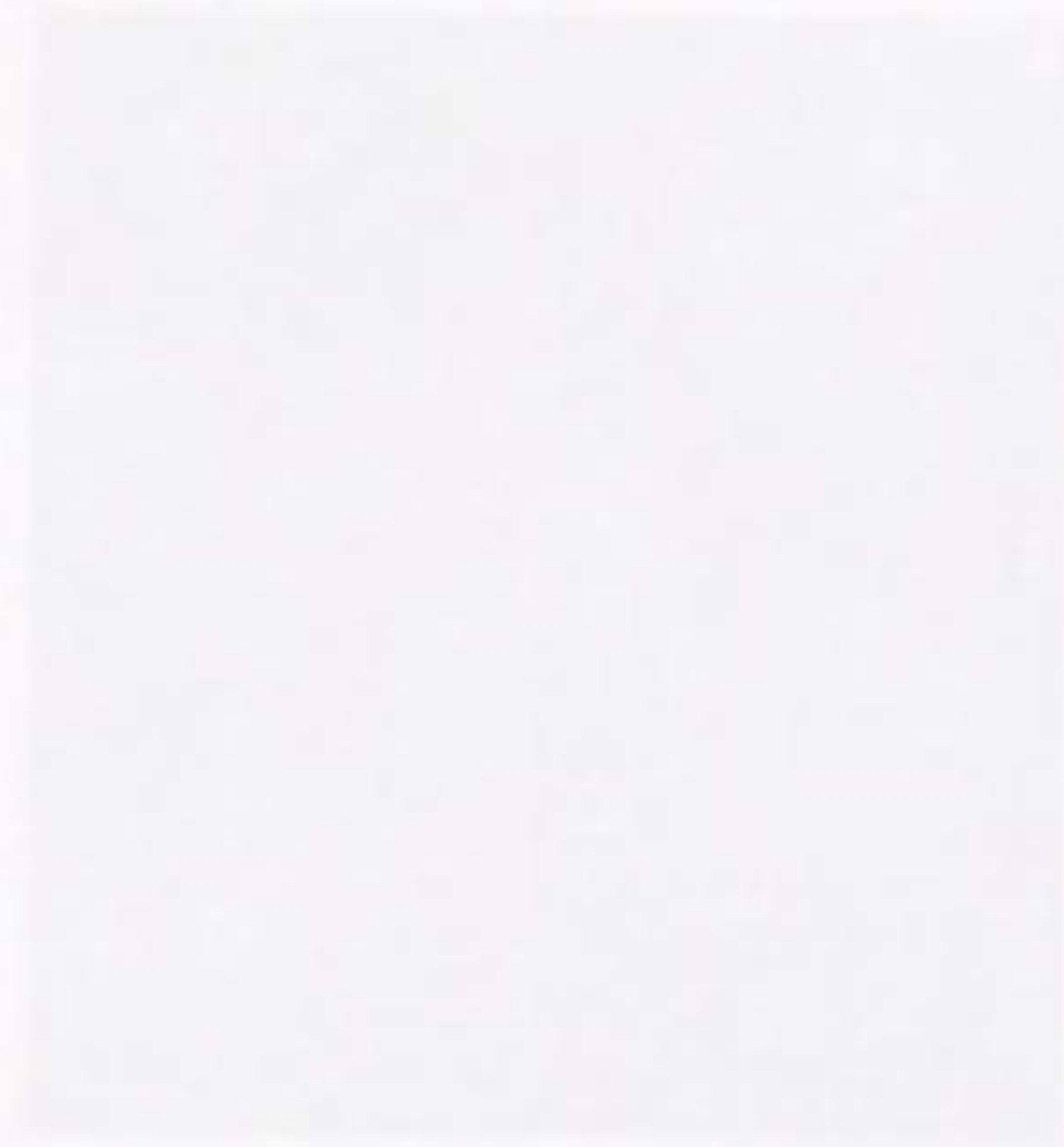


図2-7. AはStage 21の背側大動脈の抗CN32染色。Bは同じ視野のDAPI染色。血管内皮細胞（やじり）は染まっておらず、その周囲の間充細胞が染まっている。C、D、Eは、Stage 36の羽芽。羽芽の期部のピンキュリンを発現している細胞（C）が、抗CN32抗体（D）でも染まっている。EはDAPIによる核染色。Dで強く光っているのは赤血球。白線は50 μ mを表す。



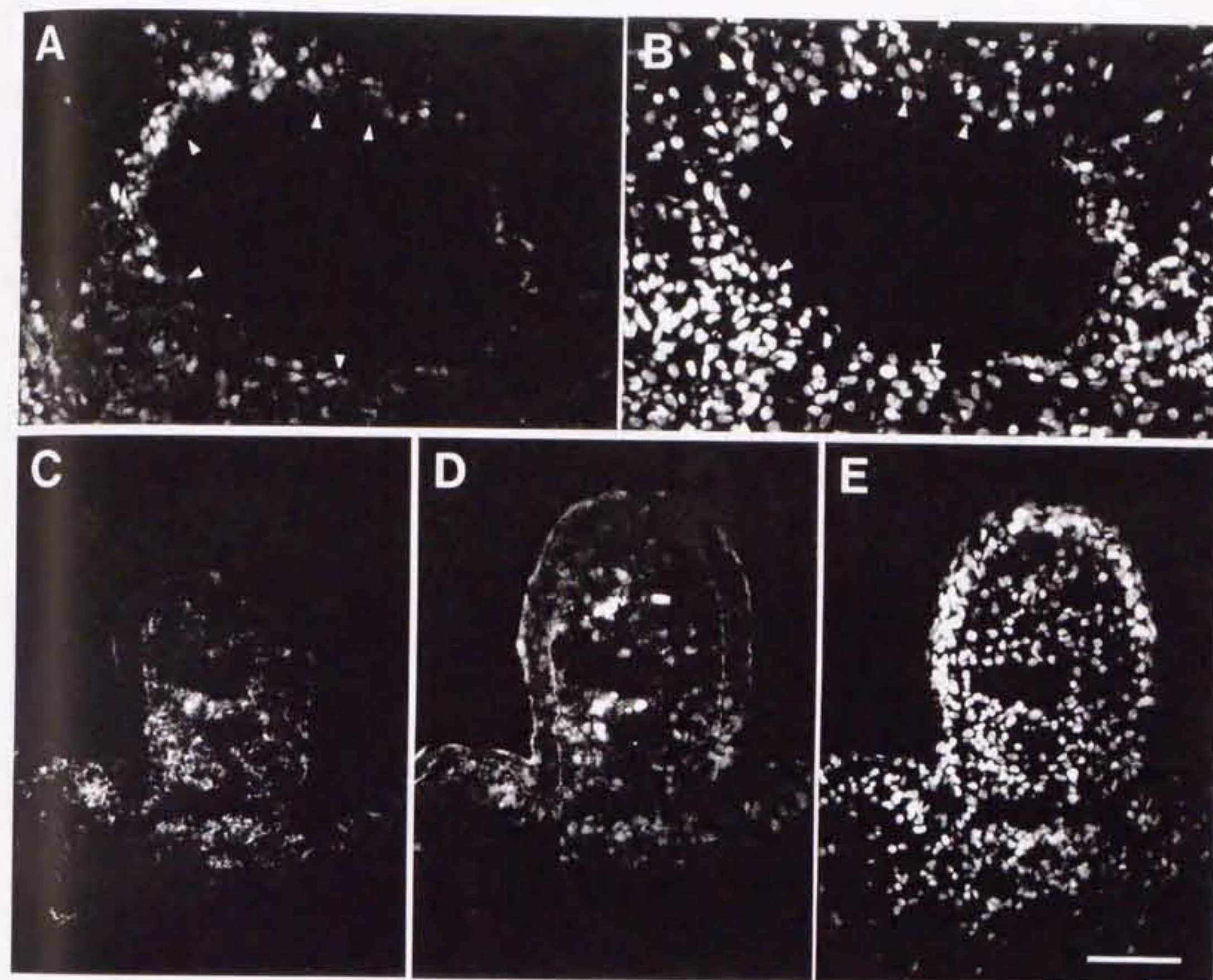


図2-8. AはStage 31の食道と気管支でのN-mycの発現。上皮を取り巻く間充細胞の核が抗CN32抗体で染色されている。Bは腸の抗CN32染色。N-mycを発現している細胞は、同時に抗ビンキュリン抗体でも染色されている(C)。DはStage 31の肺での発現。上皮に接触している間充細胞が抗CN32抗体によって染色されている。やじりは赤血球。EはDの視野のDAPI像。Br; 気管支、EE; 内胚葉性上皮、Es; 食道、SM; 平滑筋前駆組織。白線は、A、D、Eで50 μ m、B、Cで100 μ mを表す。



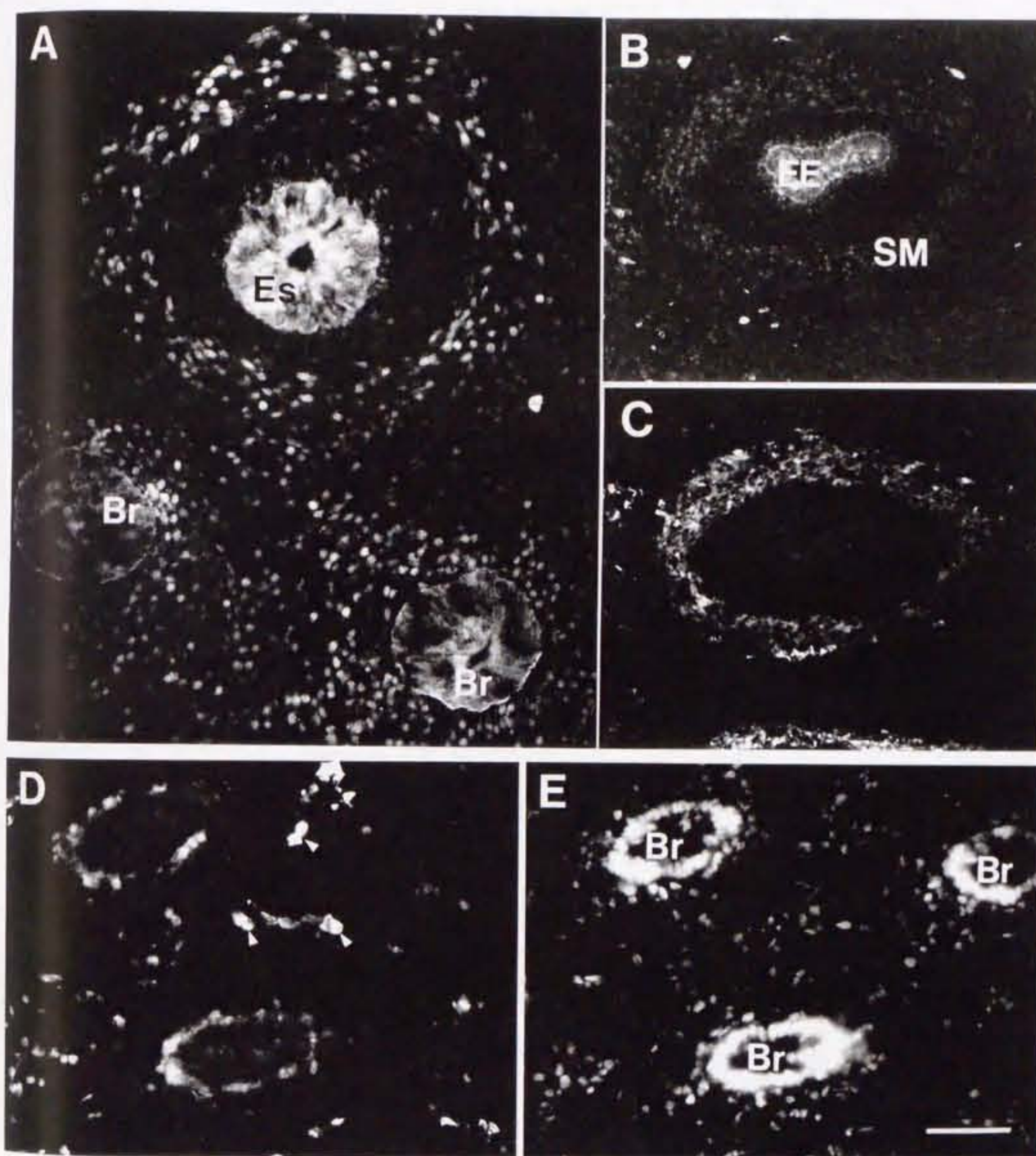


図 3 - 1. ニワトリ網膜の層分化と N - m y c タンパク質の局在。A - C は 6 日胚 (S t a g e 2 6) の同じ視野、E - G は 1 0 日胚 (S t a g e 3 6) の同じ視野、D はその近傍の切片を表す。H、I は F の枠内の拡大。A、E は位相差像、B、F、H は抗 C N 3 2 抗体による N - m y c の染色、D は予め抗原で吸収しておいた抗 C N 3 2 抗体の染色、C、G、I は D A P I による核染色。白線は A - G で 5 0 μ m、H と I で 9 0 μ m を表す。A m ; アマクリン細胞層、G a ; 神経節細胞層、P r ; 色素性網膜。

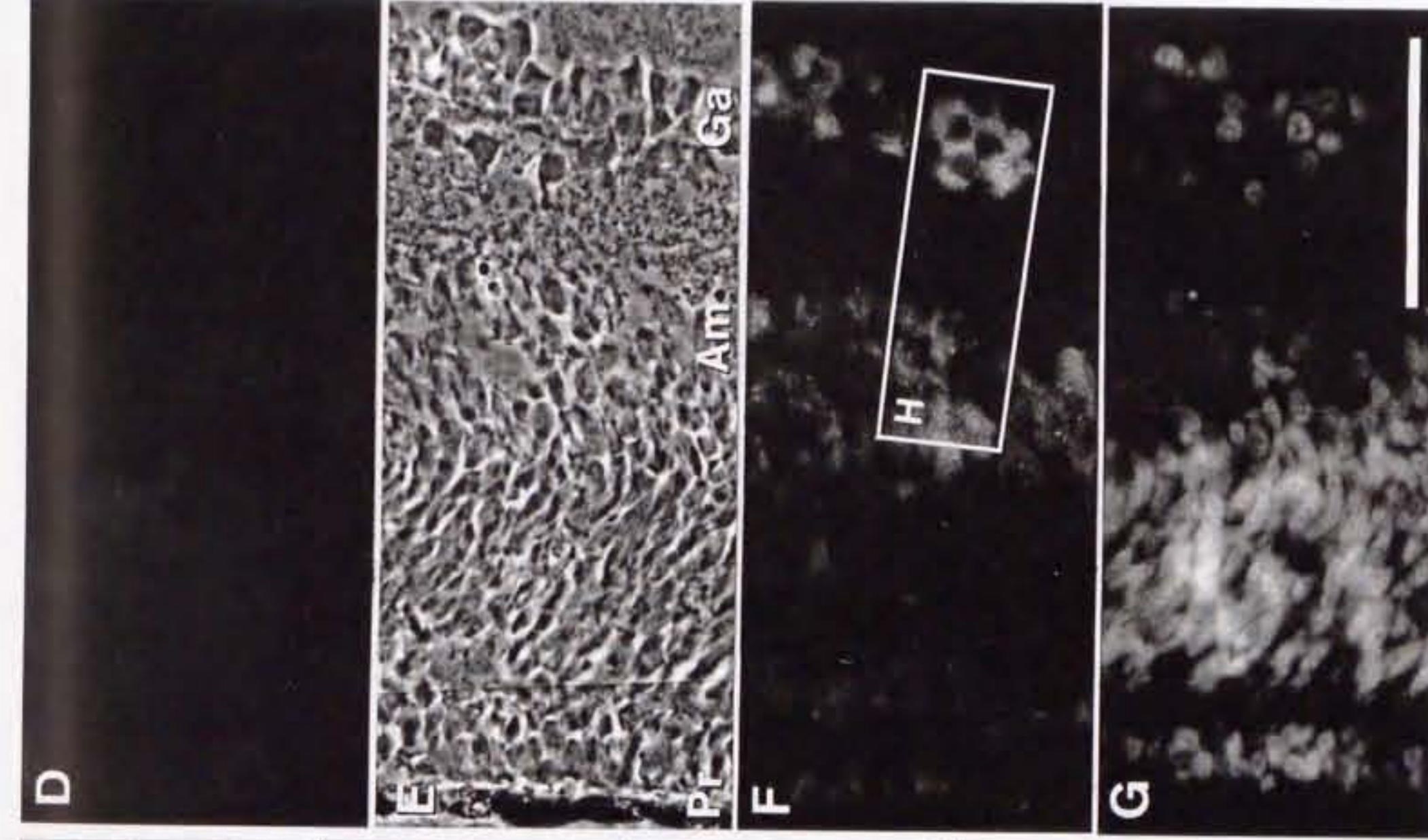
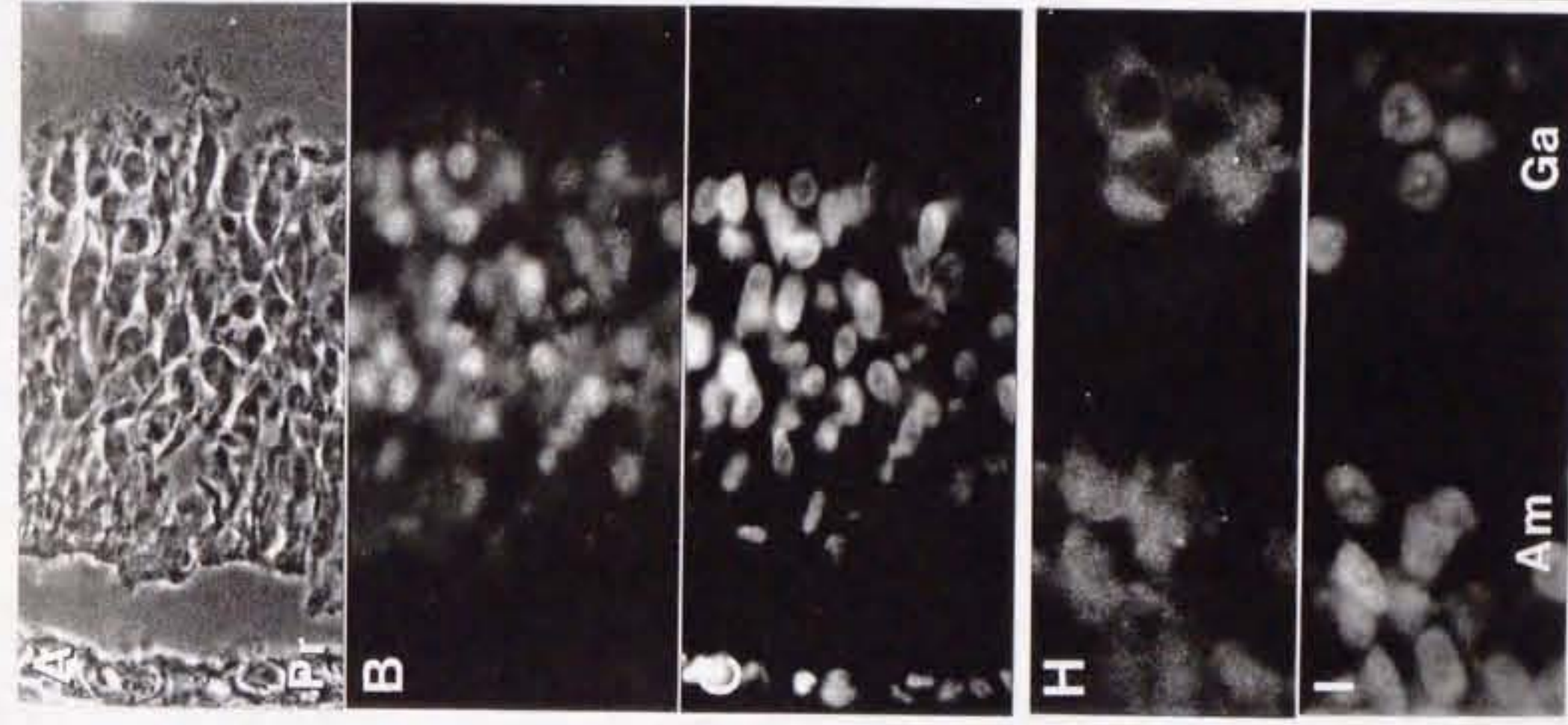


図 3-2. ニワトリ神経性網膜のウェスタンブロッティングによる解析。A ; 6 日胚網膜の 3.5×10^4 個の細胞に相当する核フラクション。B ; A の細胞質フラクション。C ; 1.5×10^4 個の細胞に相当する 10 日胚網膜の核フラクション。D ; C の細胞質フラクション。E ; 3×10^4 個の細胞に相当する 14 日胚肝臓の核フラクション。F ; E の細胞質フラクション。N-myc タンパク質は矢印で示した約 70 kDa のバンドで、その下のバンドは免疫グロブリン重鎖である。N-myc のバンドは肝臓のサンプルでは認められない。



図 3-3. マウス胚の脊髄、脊髄神経節での N-myc タンパク質の分布。A、D はそれぞれ 10.5、12.5 日胚の横断切片を抗 MN14 抗体で染色し、N-myc タンパク質を見たもの。B は A の枠内の拡大で、脊髄の一部と脊髄神経節を示す。C は B と同じ視野の DAPI 像。E、F は D の枠内の拡大で、E は脊髄神経節の一部、G は脊髄の神経上皮層付近の一部である。F、G はそれぞれの DAPI 像。E と F、G と H で、矢じり、矢印は各々同じ細胞を指している。白線は、A、C、D で 50 μ m、F と H で 25 μ m を表す。



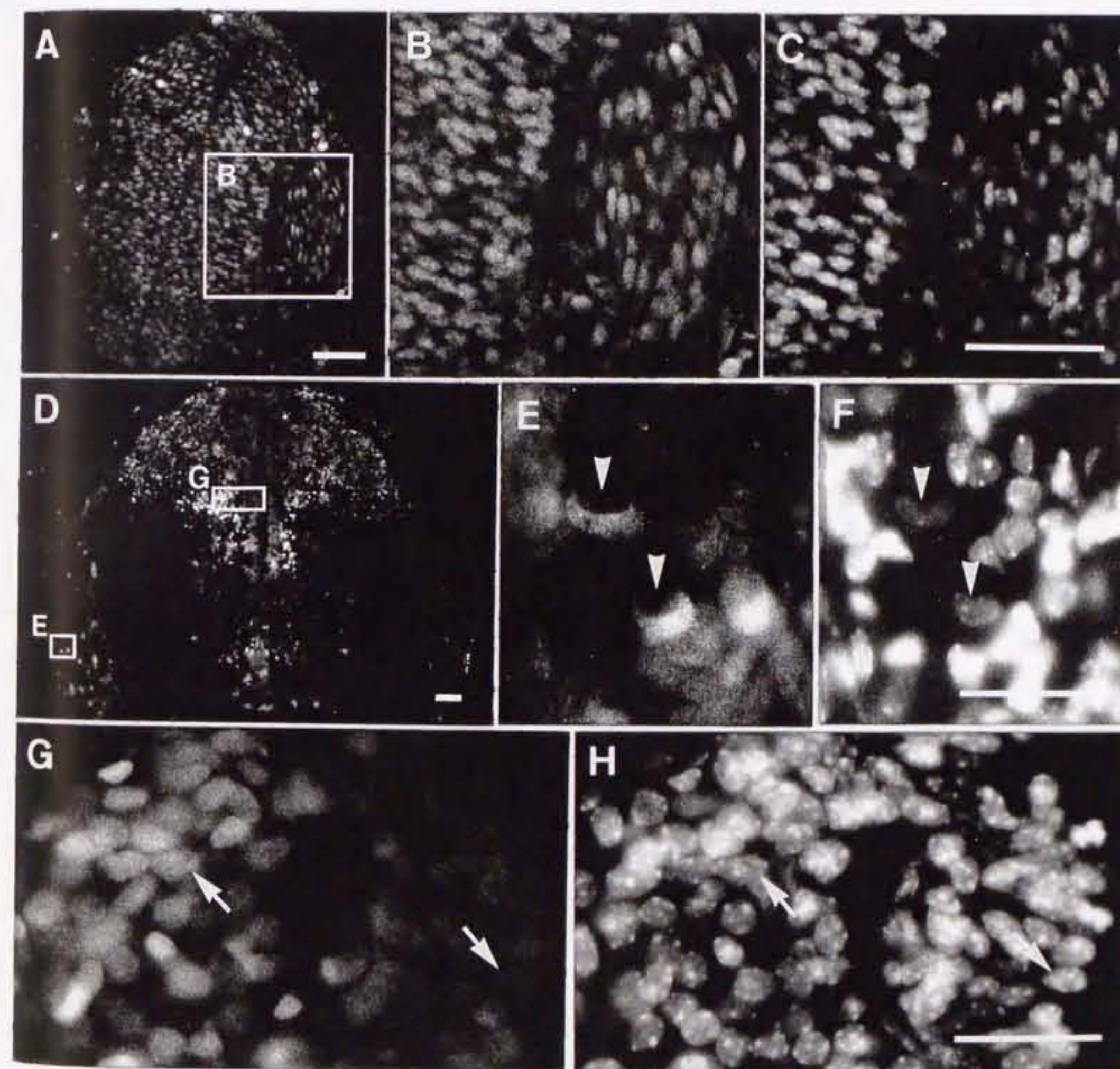




図 3 - 4. 培養した脊髄神経節での細胞質の N - m y c タンパク質。9 日胚の脊髄神経節を 5 日間培養し、抗 C N 3 2 抗体で染色した。

A はその共焦点レーザー顕微鏡像。B は同じ視野の明視野像。見えないが、N - m y c タンパク質を持つ細胞の周囲には小型のサテライト細胞が多くいる。

棒線は $25\ \mu\text{m}$ を表す。



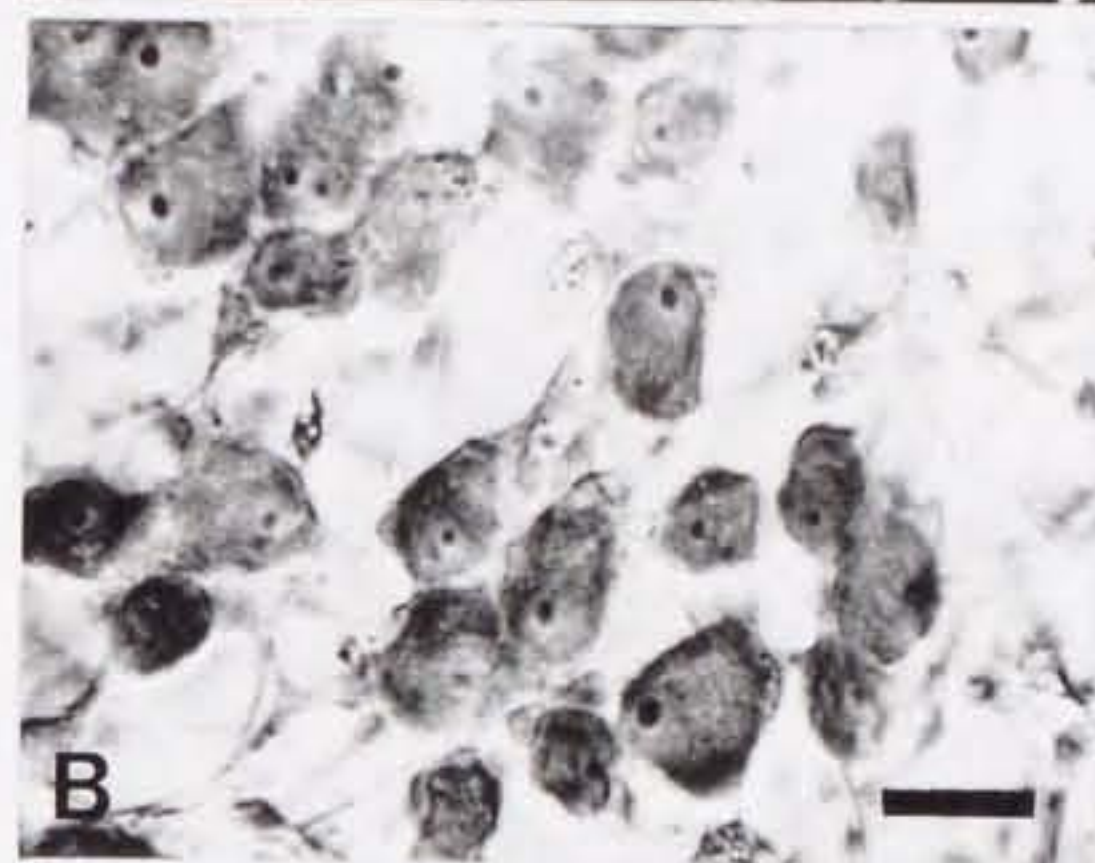


図3-5. 培養神経冠細胞でのN-mycタンパク質の局在の変化。A-Dはウズラ神経冠細胞を単離、培養後1日目の同じ視野。E-Hは培養後8日目で、神経細胞や色素細胞などが分化してきている。A、Eは抗CN32抗体染色、BはDAPI、Cは抗ニューロフィラメント染色、Dは位相差像を示す。矢じりは同じ細胞を指し、神経に良く分化してN-mycタンパク質を細胞質に持っている例を示している。傍線は25 μ m。



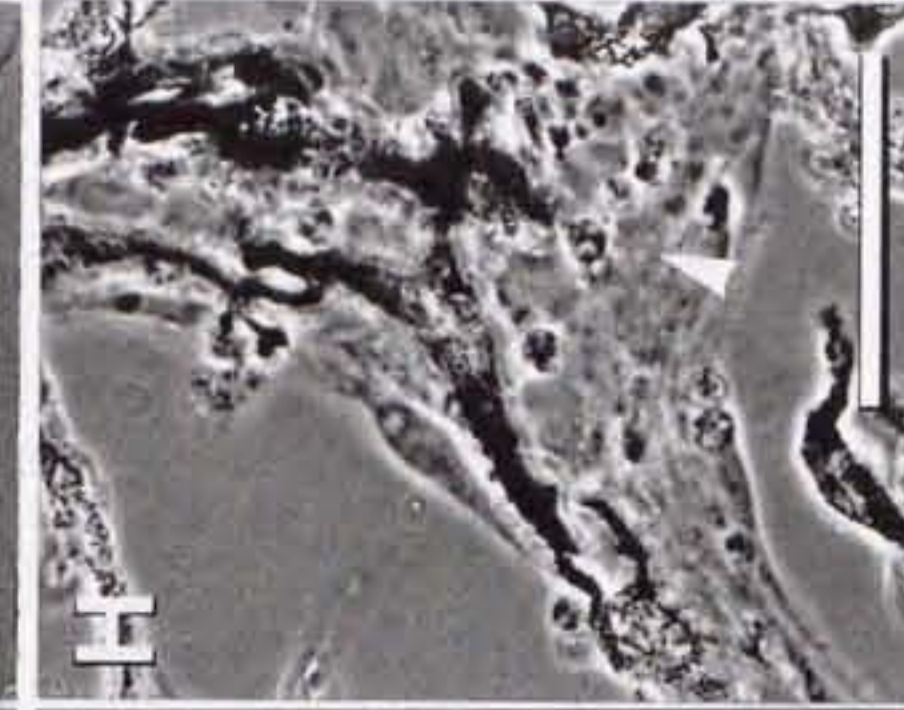
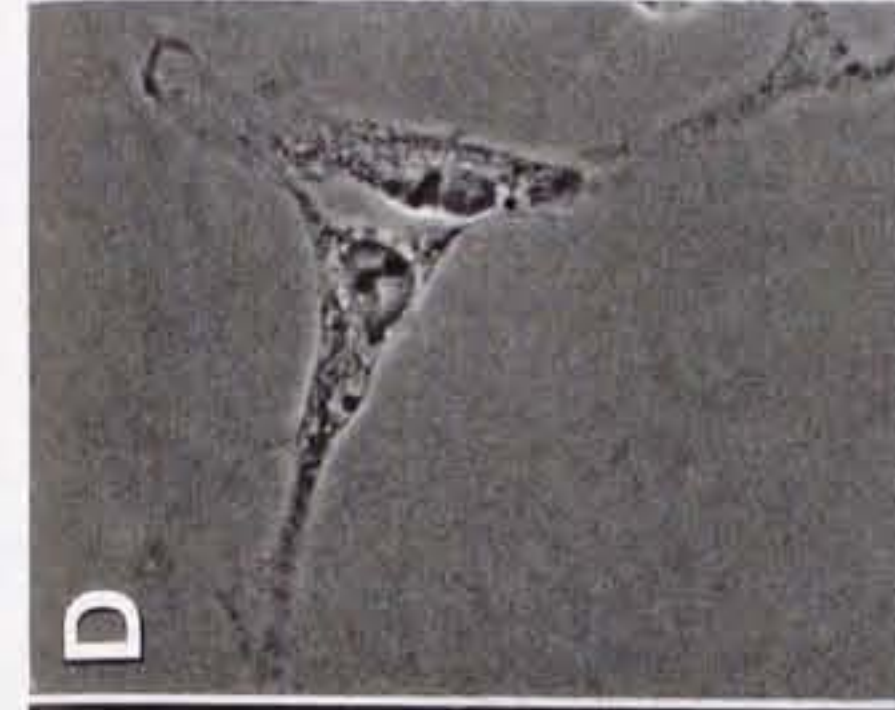
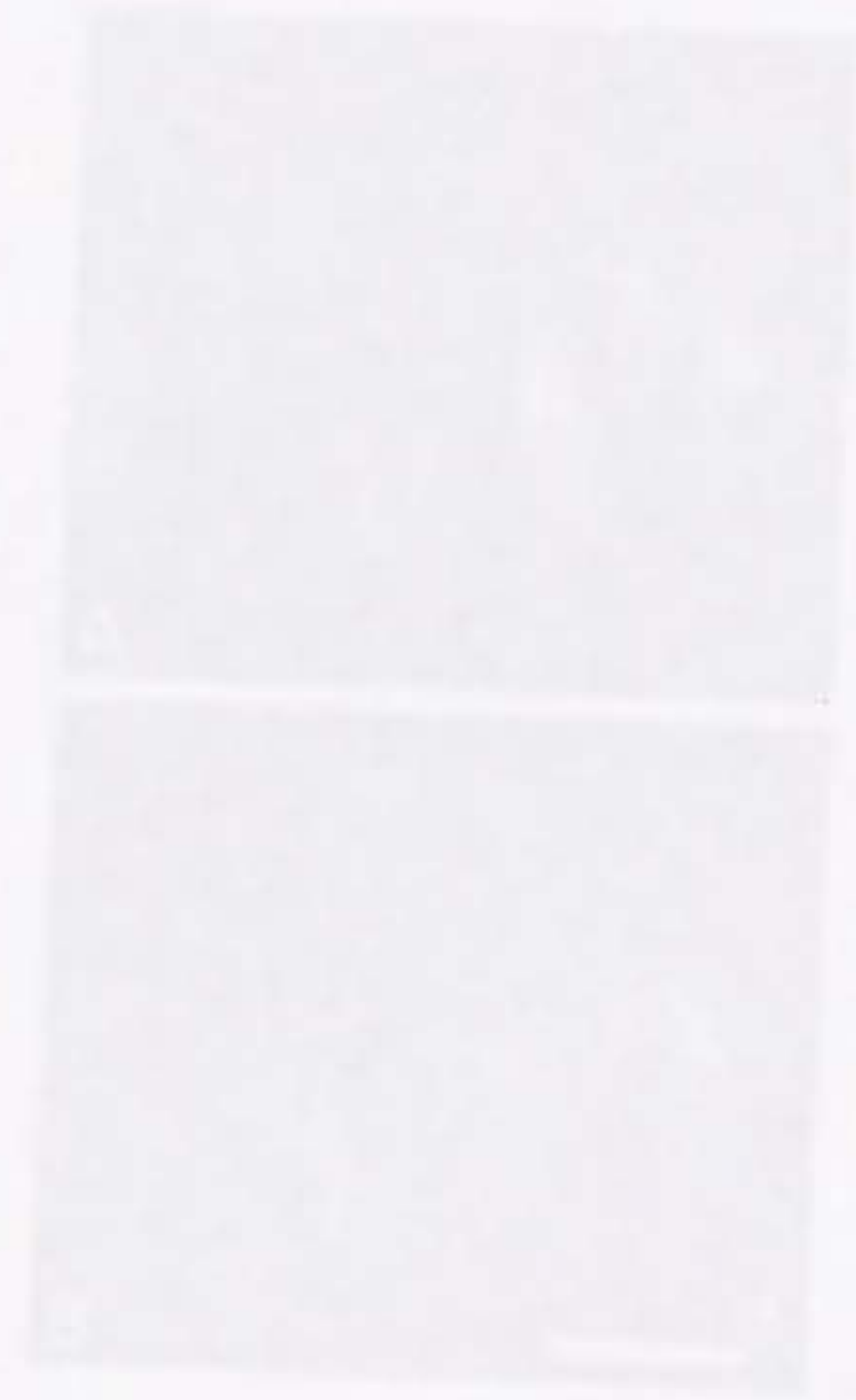


図 3 - 6. ニワトリ 14 日胚の小脳プルキンエ細胞での N - m y c タンパク質
の細胞質への蓄積。小脳葉の基部側の比較的成熟の進んでいるプルキンエ細胞
を示した。A は抗 C N 3 2 染色、B は同じ視野の抗ニューロフィラメント染色。
白線は $20\ \mu\text{m}$ 。



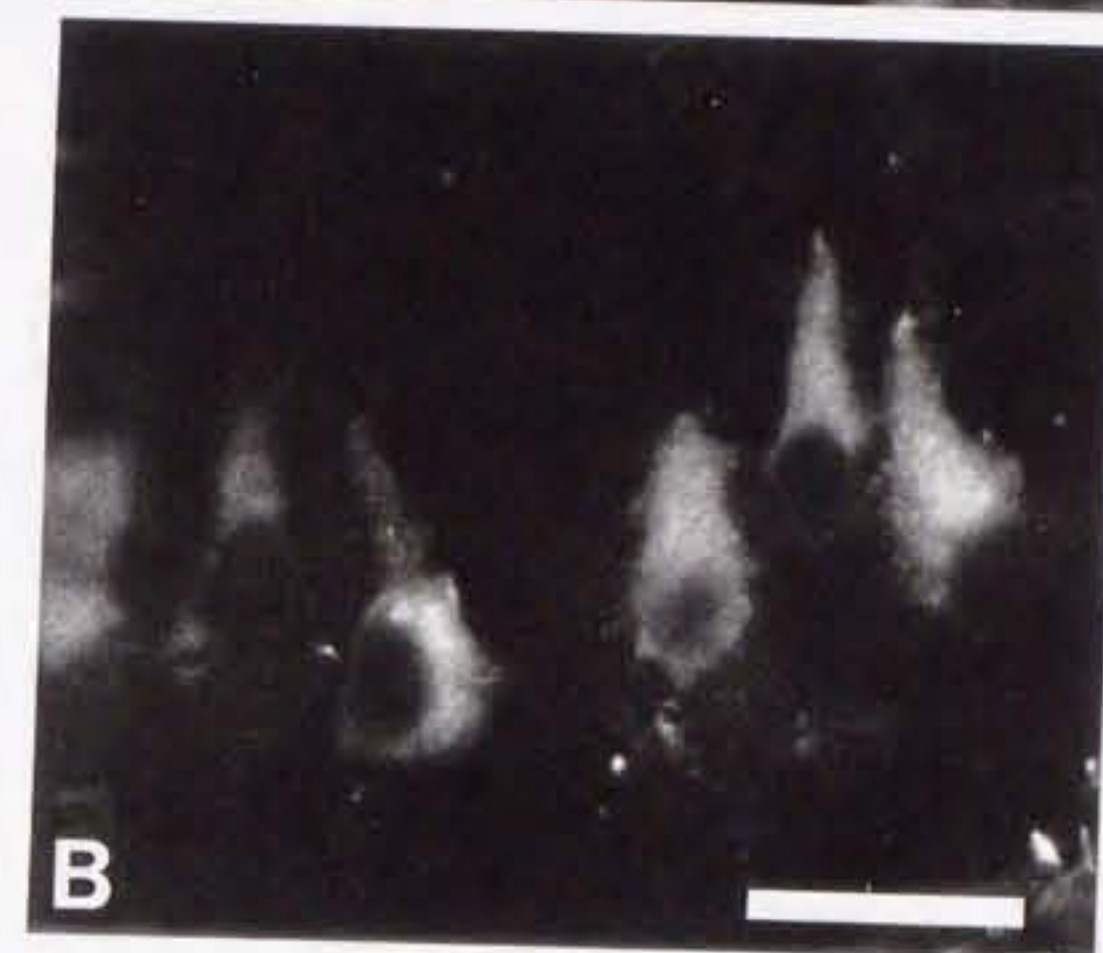


図4-1. 肢の発達に伴うN-mycの発現の変化。全て*in situ*ハイブリダイゼーション。AはStage 17の横断切片で、間もなく肢芽の出来てくるであろう体壁部分を示している。BはStage 19の前肢芽の横断切片で、左が先端。CはStage 18の前肢芽の縦断切片。右上が先端。DはStage 26の後肢芽の縦断切片。A: 前方、P: 後方、AER: 外胚葉性頂堤、C: 指軟骨。白線はA、Bで100 μ m、C、Dで200 μ mを表す。



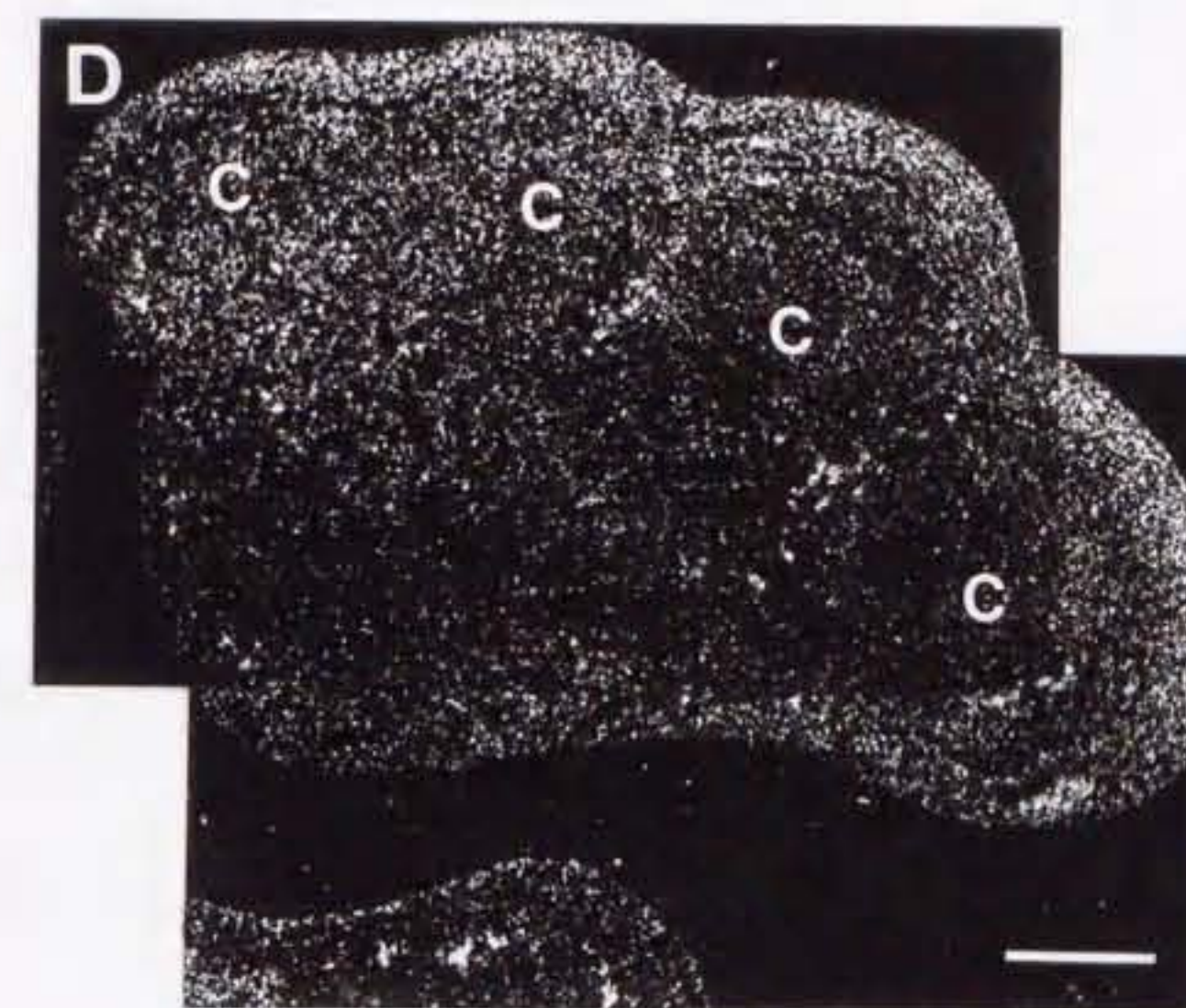
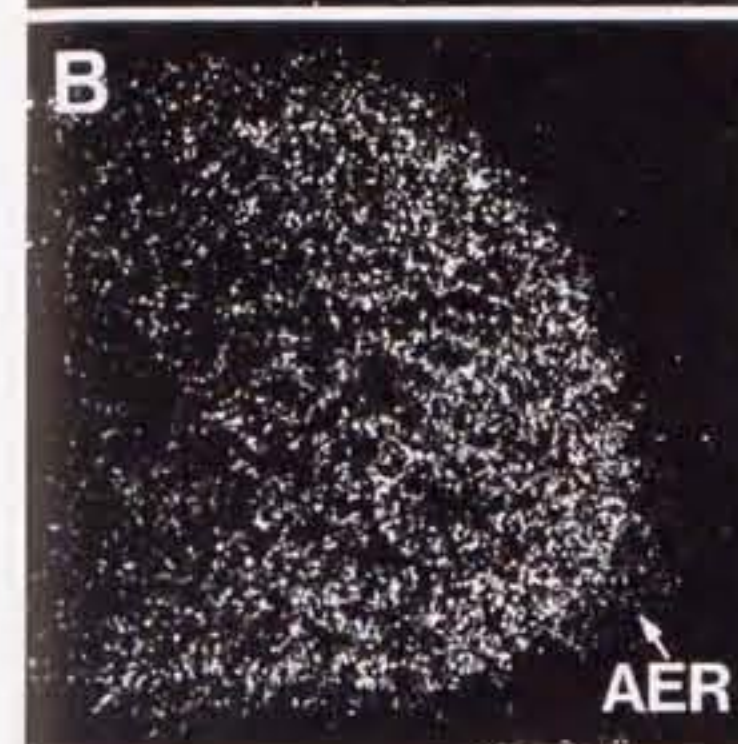
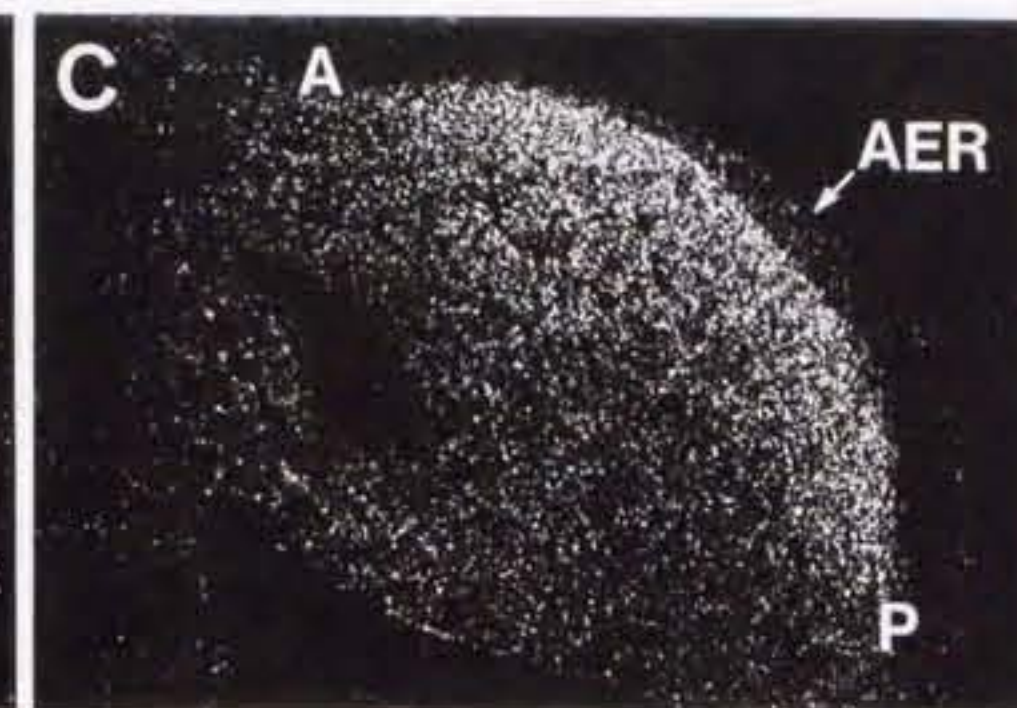
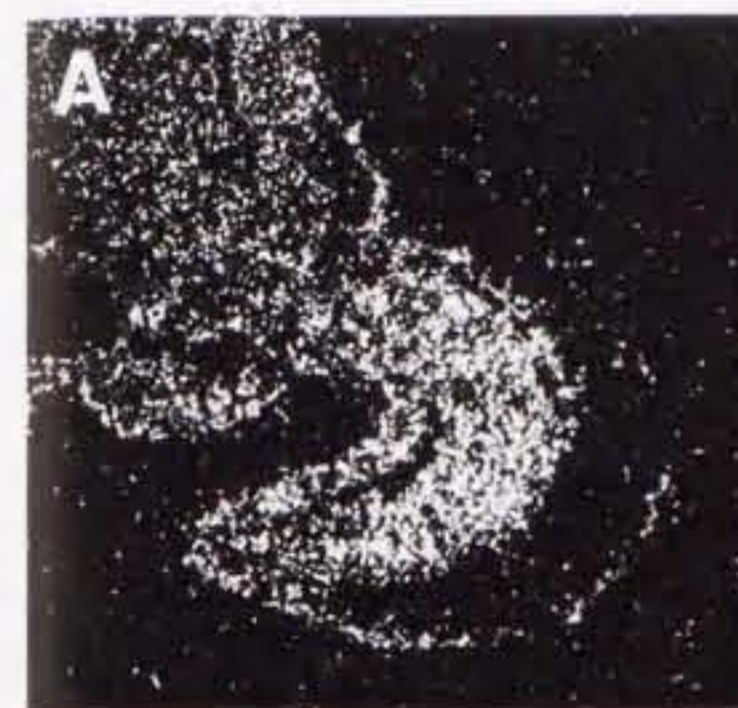


図4-2. レチノイン酸を投与した場合のN-myc遺伝子の発現の変化。左から順に、レチノイン酸投与後12時間後、24時間後でのN-mycの発現(*in situ*ハイブリダイゼーション)、6日後の重複指数の数(アルシアングリーン染色)。上から順に、コントロールのDMSOのみ、1mg/ml、10mg/mlのレチノイン酸。A: 前方、D: 先端方向、P: 後方。



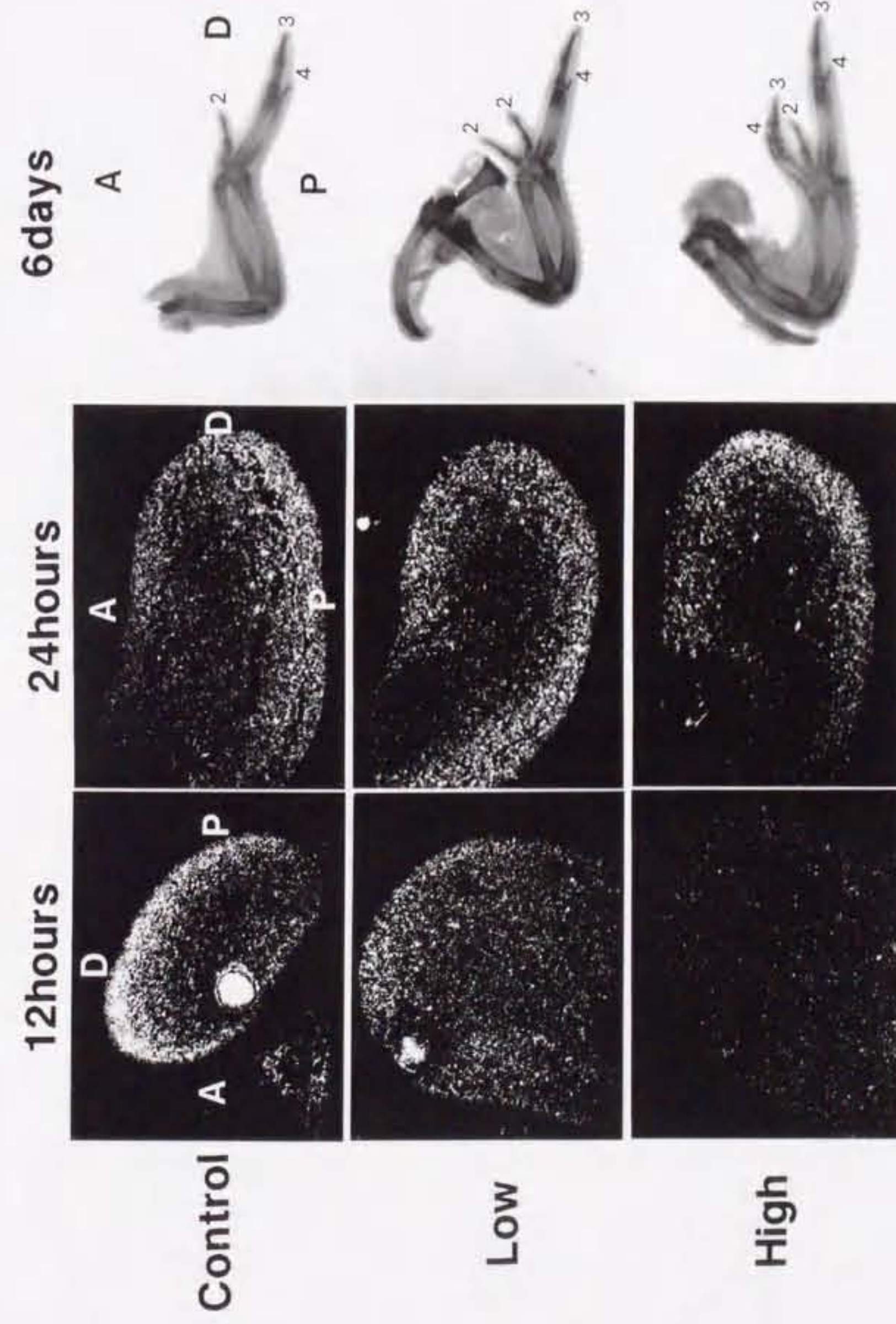


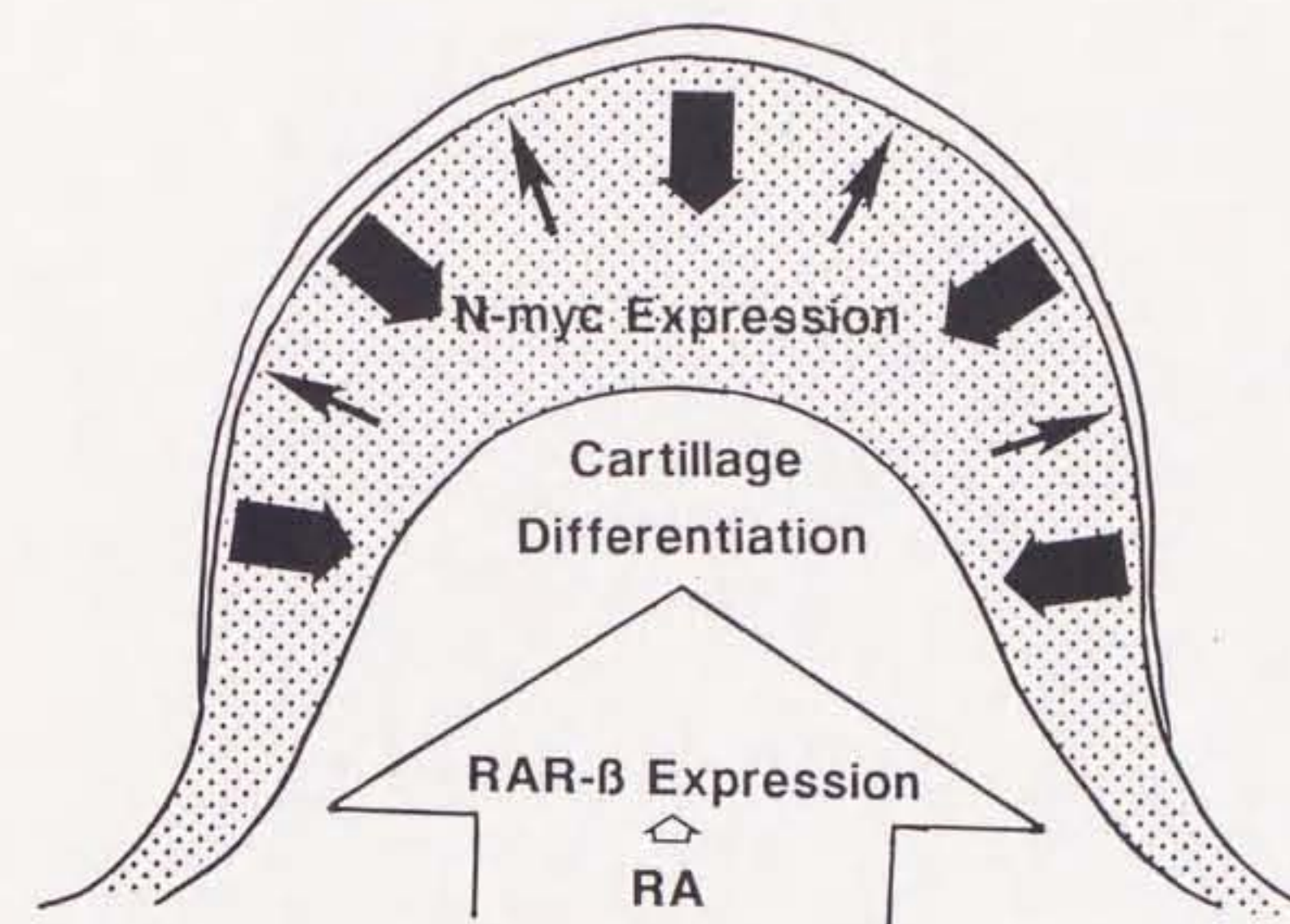
図4-3. 外胚葉性頂堤を除去した場合のN-myc遺伝子の発現 (*in situ*ハイブリダイゼーション)。左下の矢印で示した方がAERを除いてある。BはAERを除去して6日間後の前肢の一例。先端の構造に異常がある。白線は200 μ m。





図 4 - 4 . 枝芽の発生における N - m y c の発現調節のモデル。

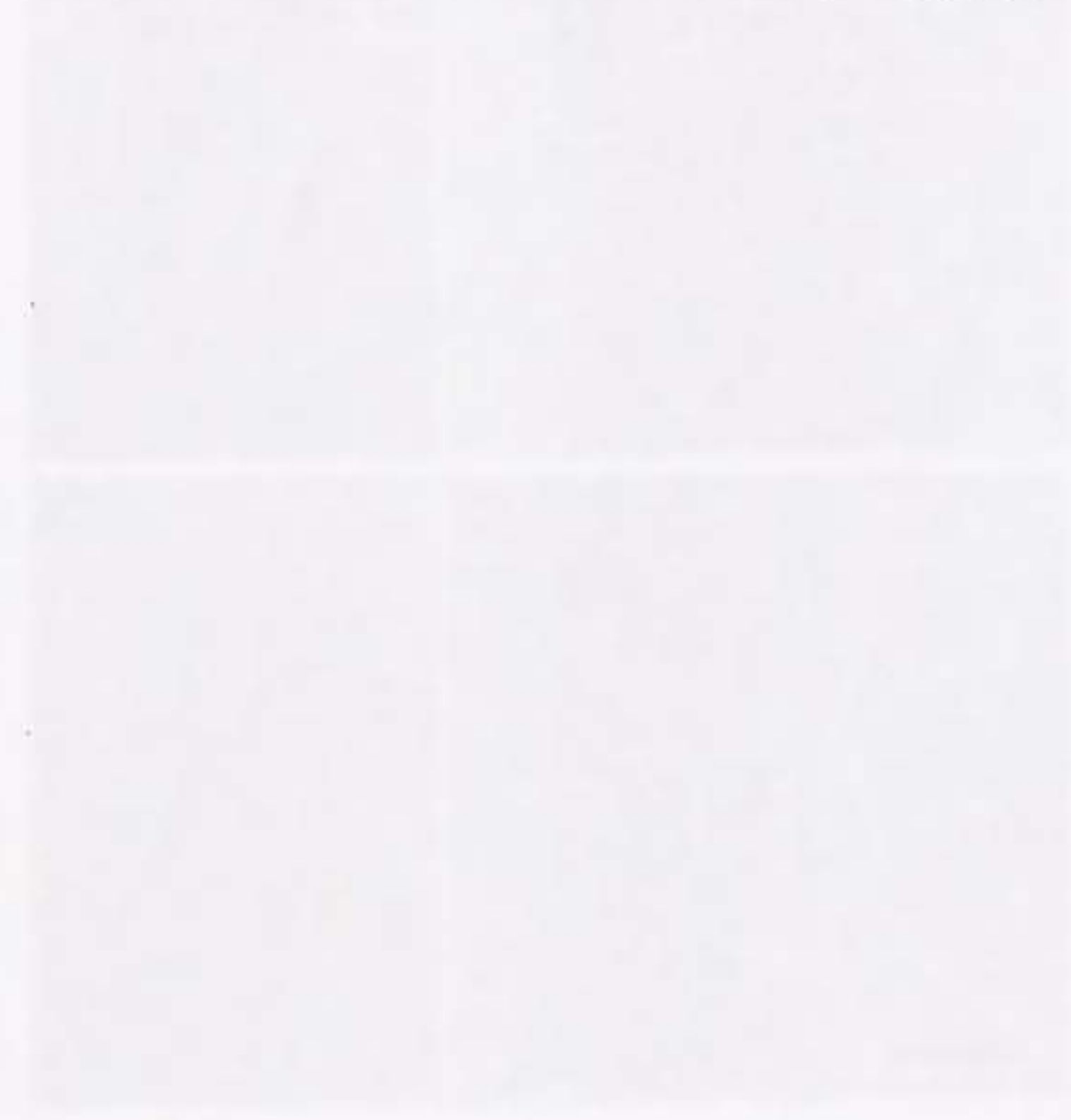




- { Ectodermal differentiation Inhibition
 Induction of N-myc Expression?
- Maintenance of AER



図5-1. 大脳の層構造の比較。A、Bは野生型、C、DはN-myc変異体。
B、DはそれぞれA、Cの大脳半球の拡大。野生型で矢印で示した皮質層が、
変異体ではほとんど見られない。Di；間脳、Me；後脳、My；髄脳、T
e；大脳半球。棒線はA、Cで1mm、B、Dで50 μ mを表す。



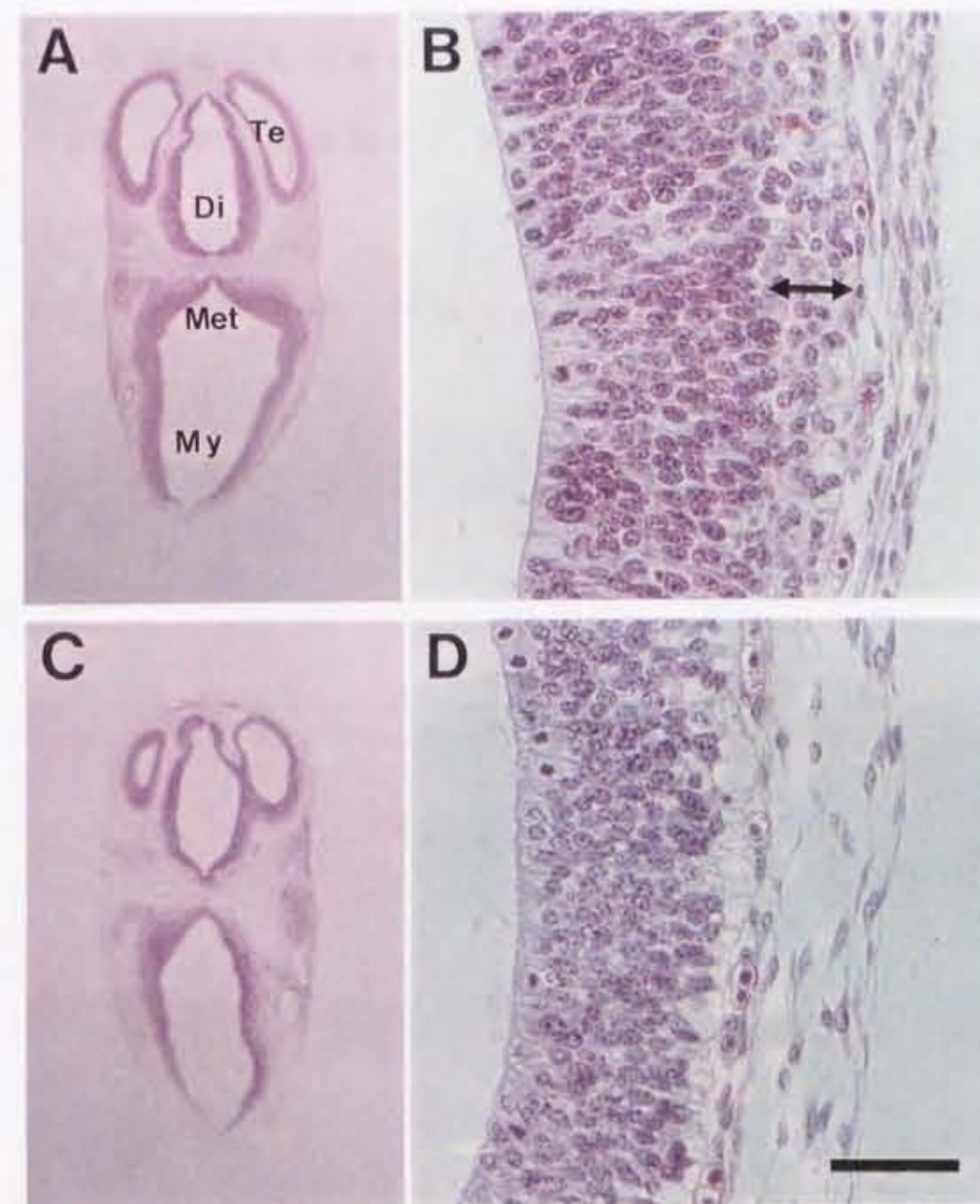


図 5 - 2. 脊髄、脊髄神経節の形態の比較。A、B は野生型、C、D は変異体。
B、D は A、C の拡大。変異体では、点線矢印で示した神経上皮層はほとんど
変わらないが、太矢印で示した神経細胞の層が狭く、細矢印で示した白質層が
ほとんど無い。また、脊髄神経節が小さいが、細胞密度が高くなっているのが
解る。

SC ; 脊髄、SG ; 脊髄神経節。棒線は、A、C で $200\mu\text{m}$ 、B、D で $50\mu\text{m}$ を表す。

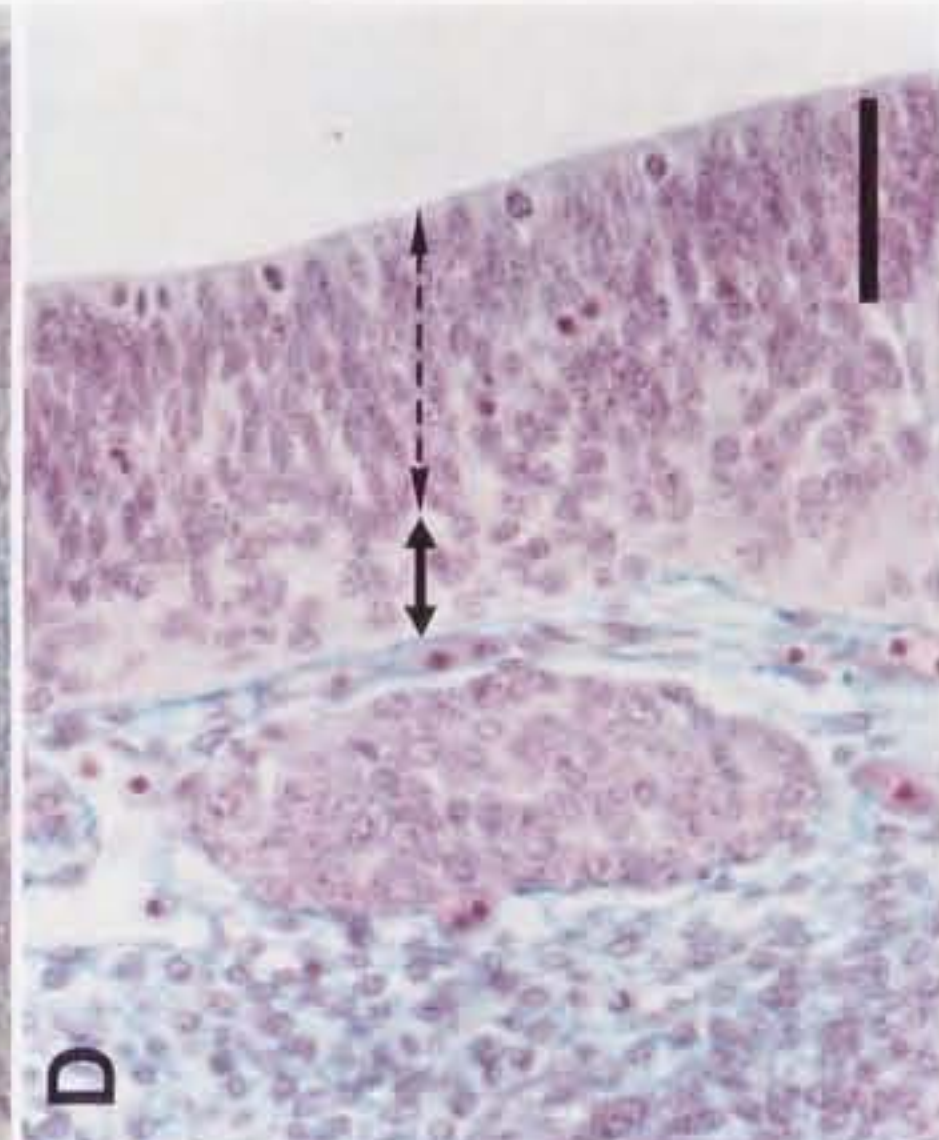
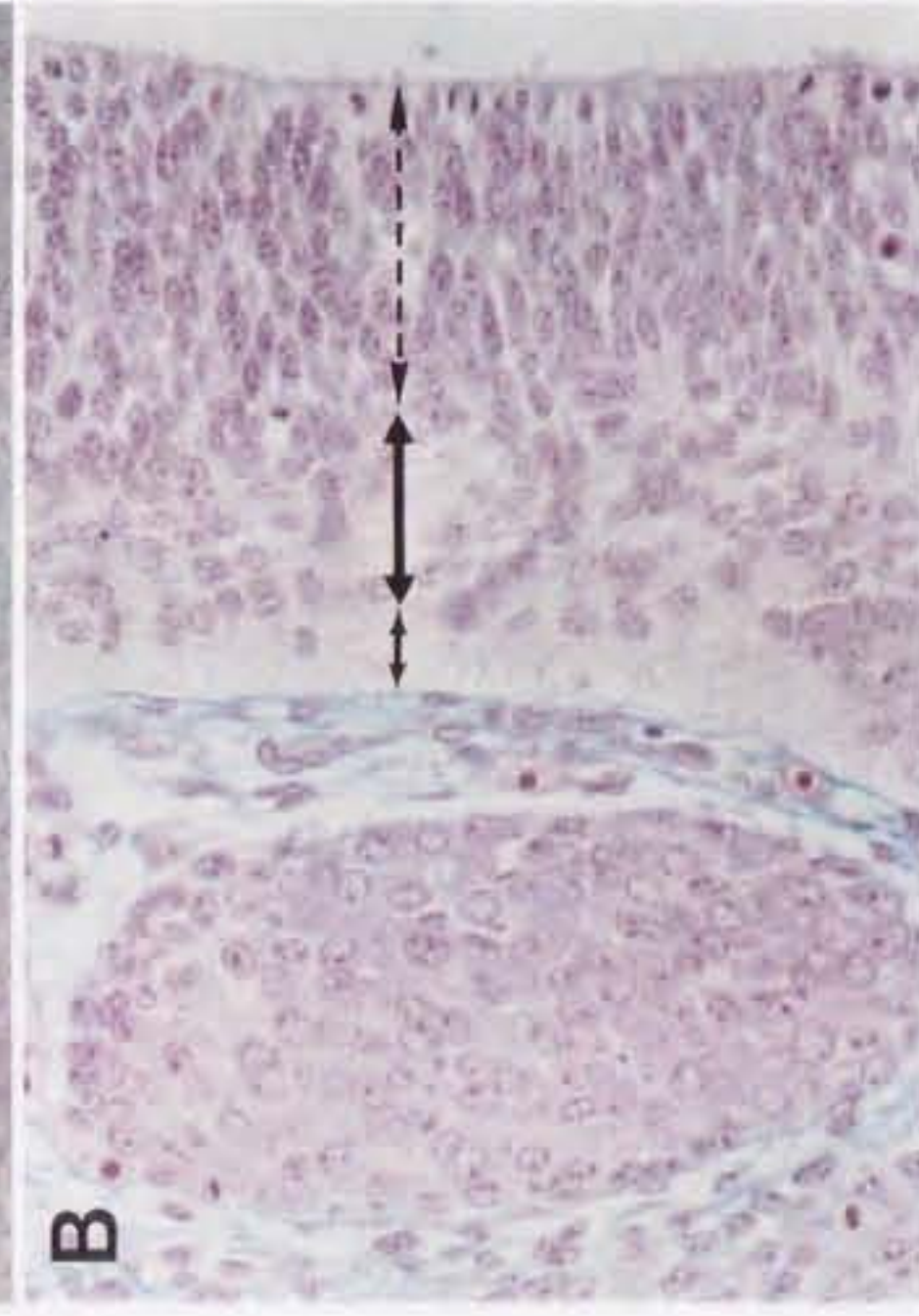
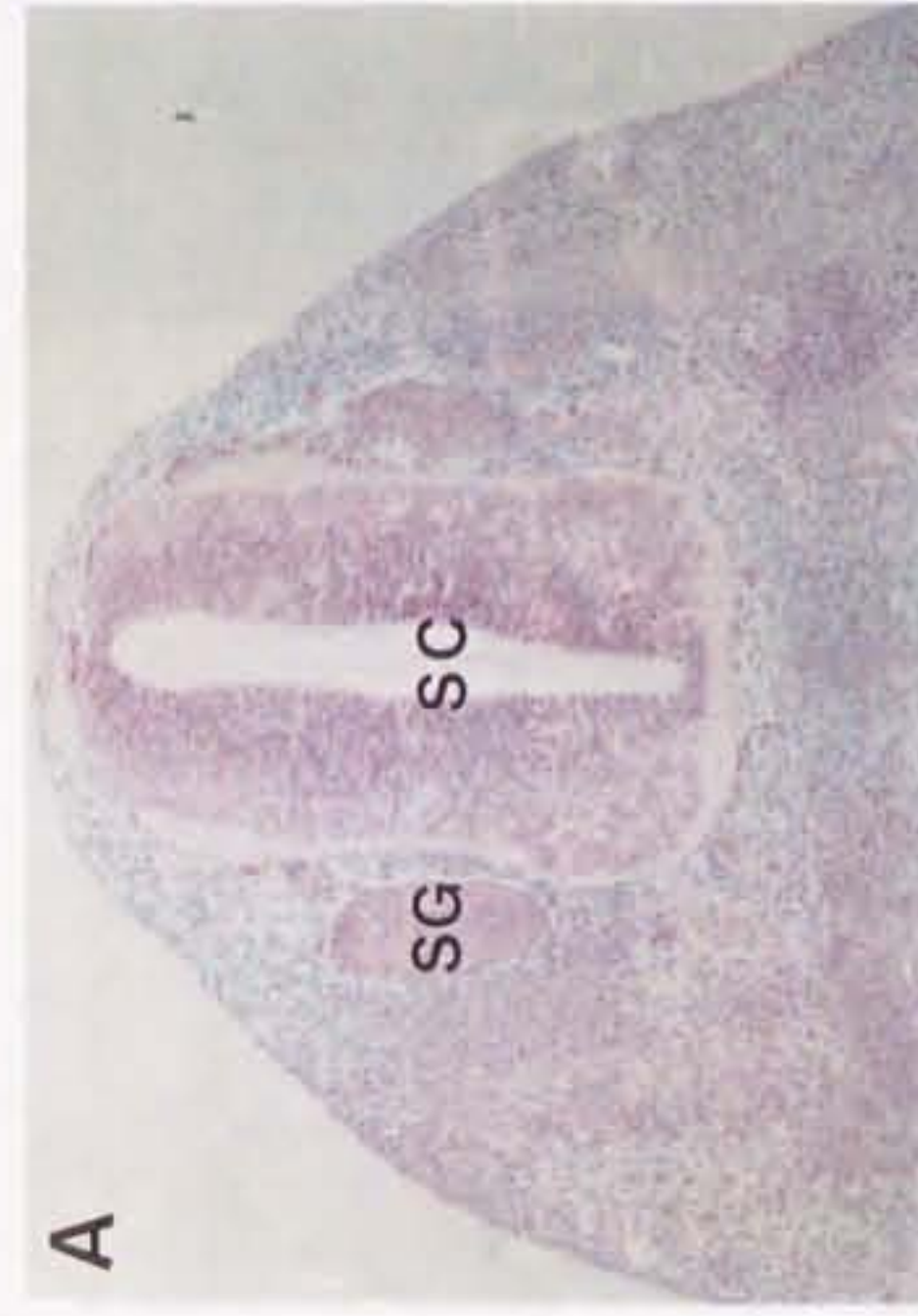
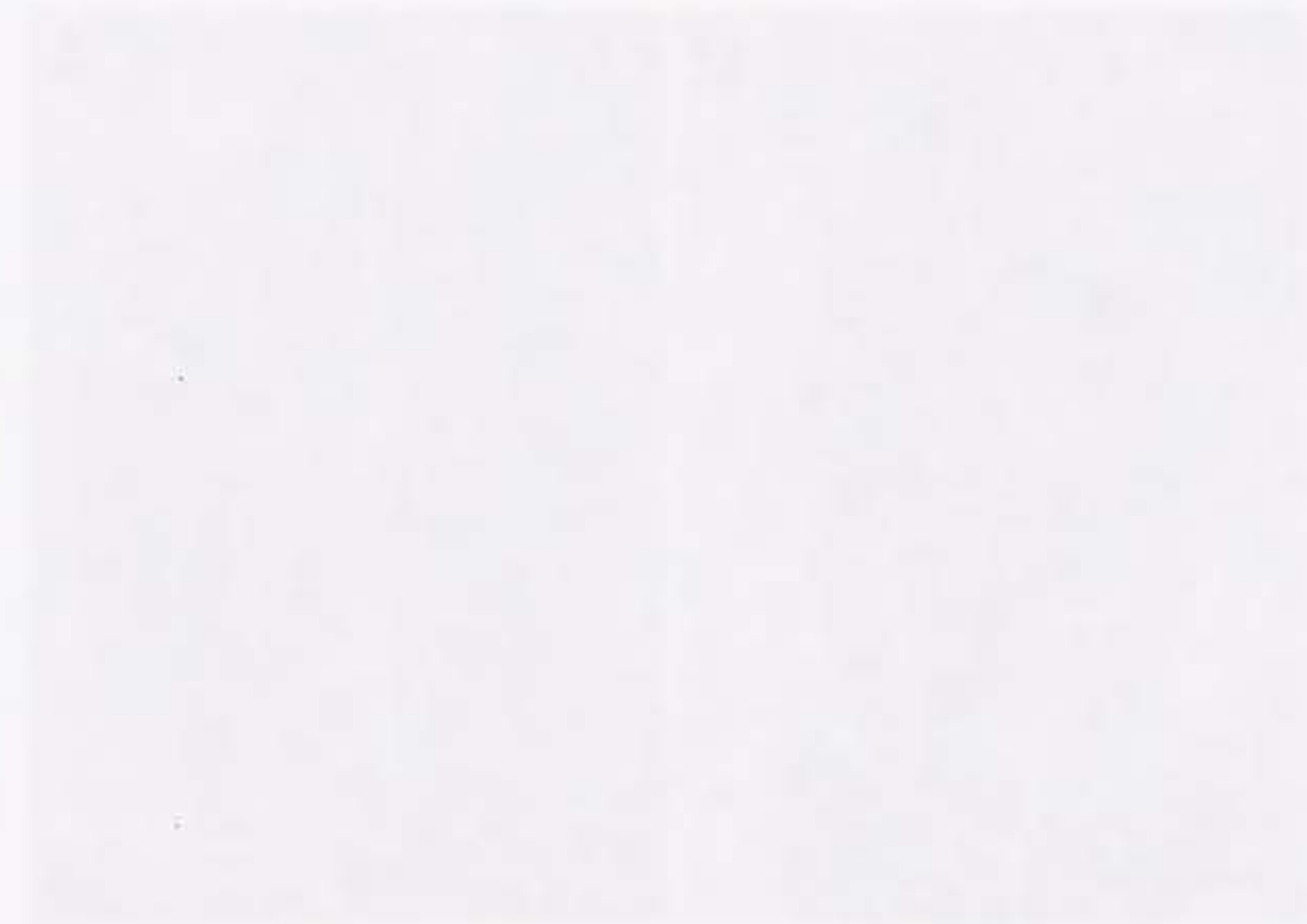


図 5 - 3. 内臓の形態の比較。A は野生型、B は変異体。矢印で示したように、変異体では中腎細管の数が少ない。また、変異体では胃らしい構造が見当たらない。Li ; 肝臓、MN ; 中腎、S ; 胃、SC ; 脊髄。棒線は 500 μ m を表す。



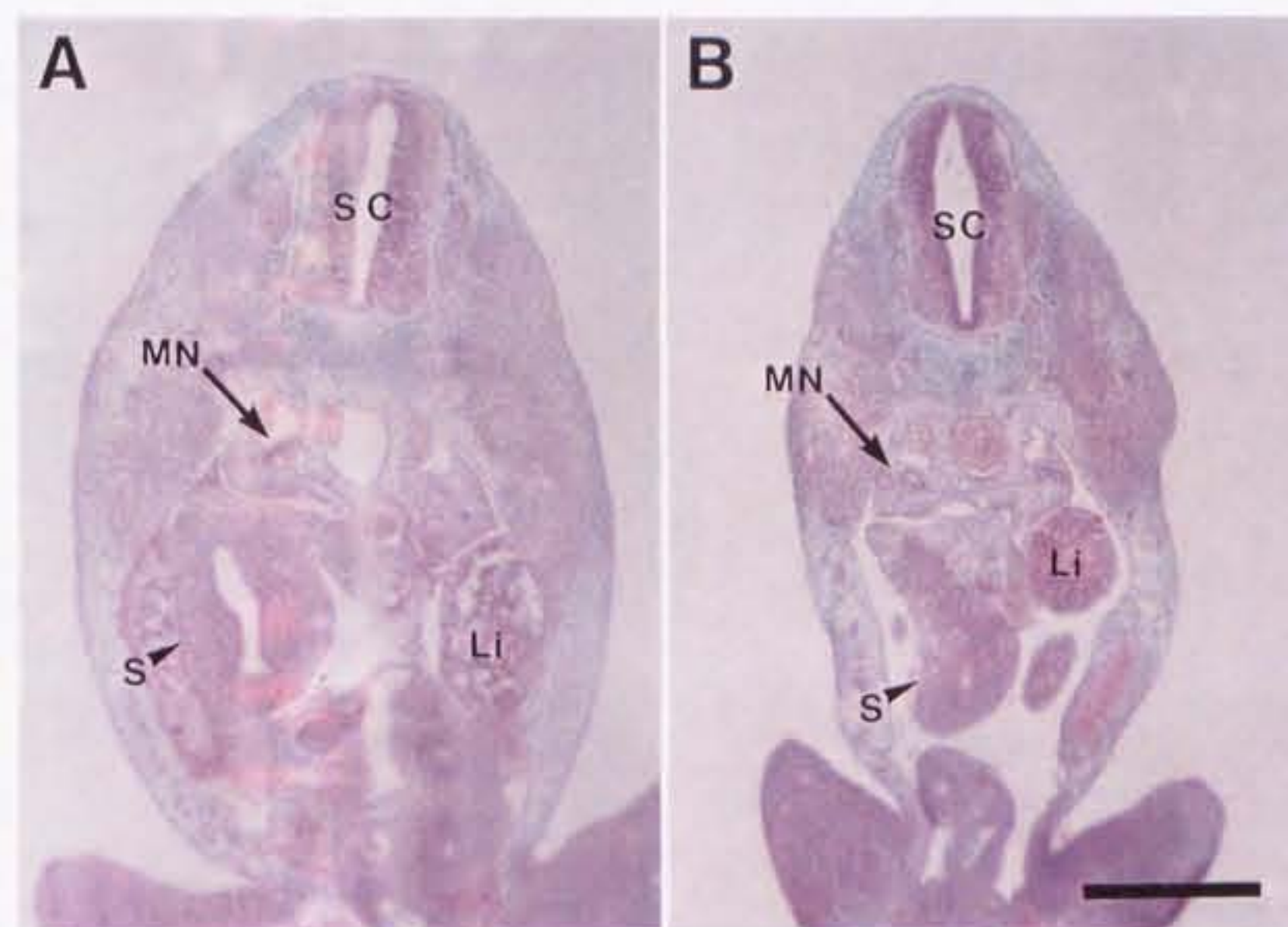


図 5 - 4. 心臓と肝臓の表現型の違い。A、B が心臓、C、D が肝臓。A、C は野生型、B、D は変異体。B に示したように、変異体では心筋層の発達が悪く、層が薄い矢印は心内膜、矢じりは心外膜を指す。肝細胞は正常だが、変異体は小葉に分かれない。MC ; 心筋層。棒線は A、B で $50\mu\text{m}$ 、C、D で $100\mu\text{m}$ を表す。

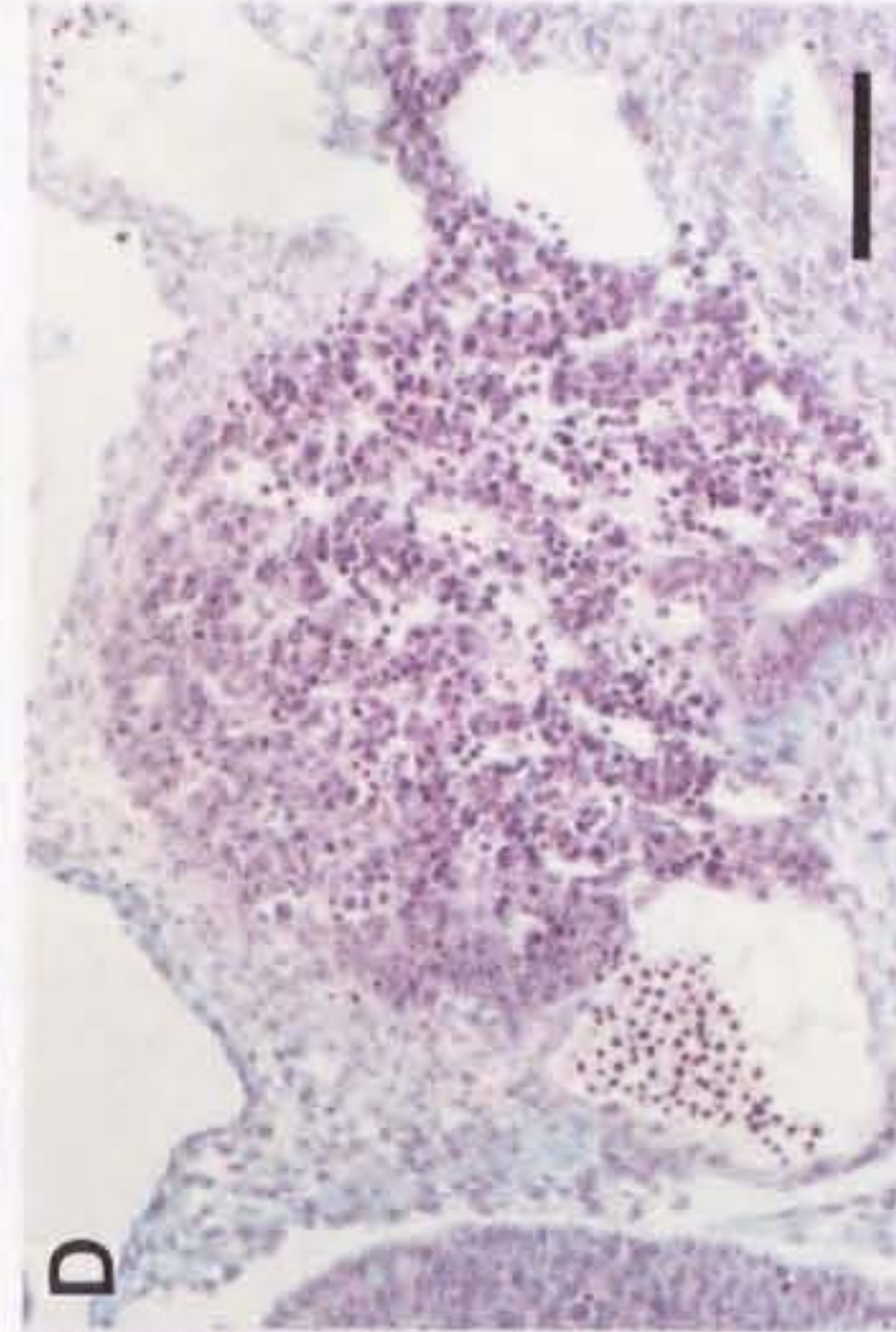
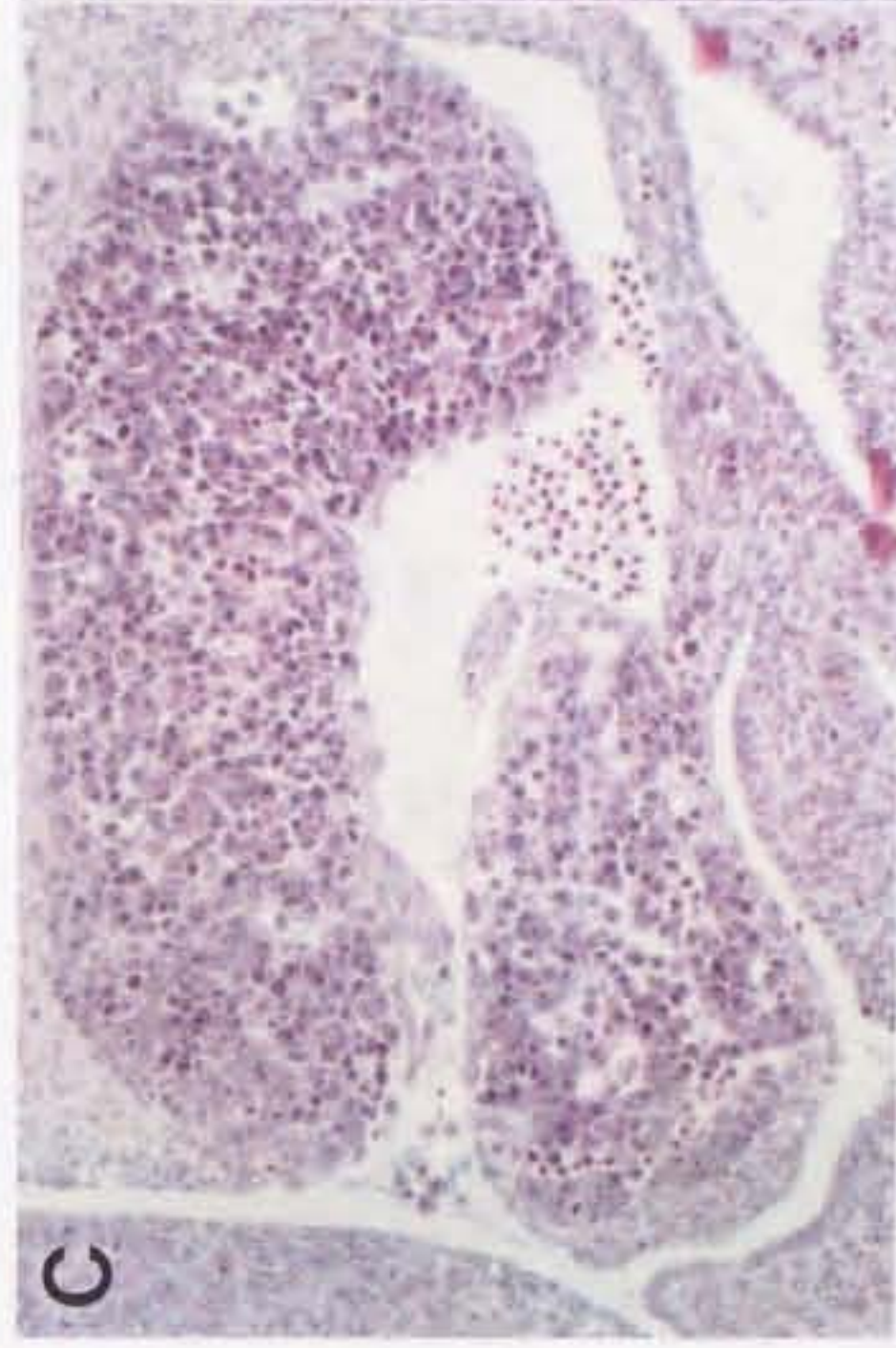
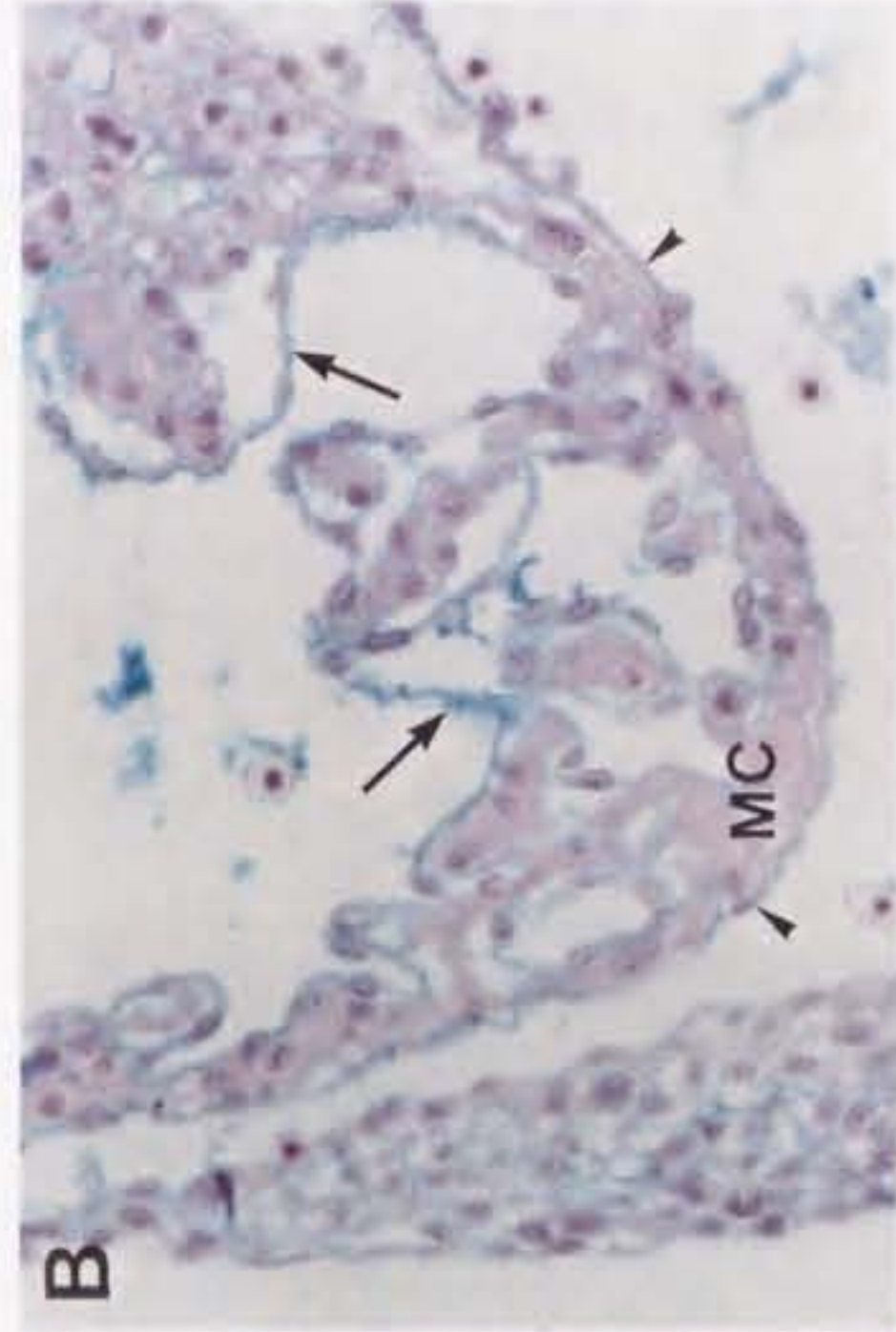
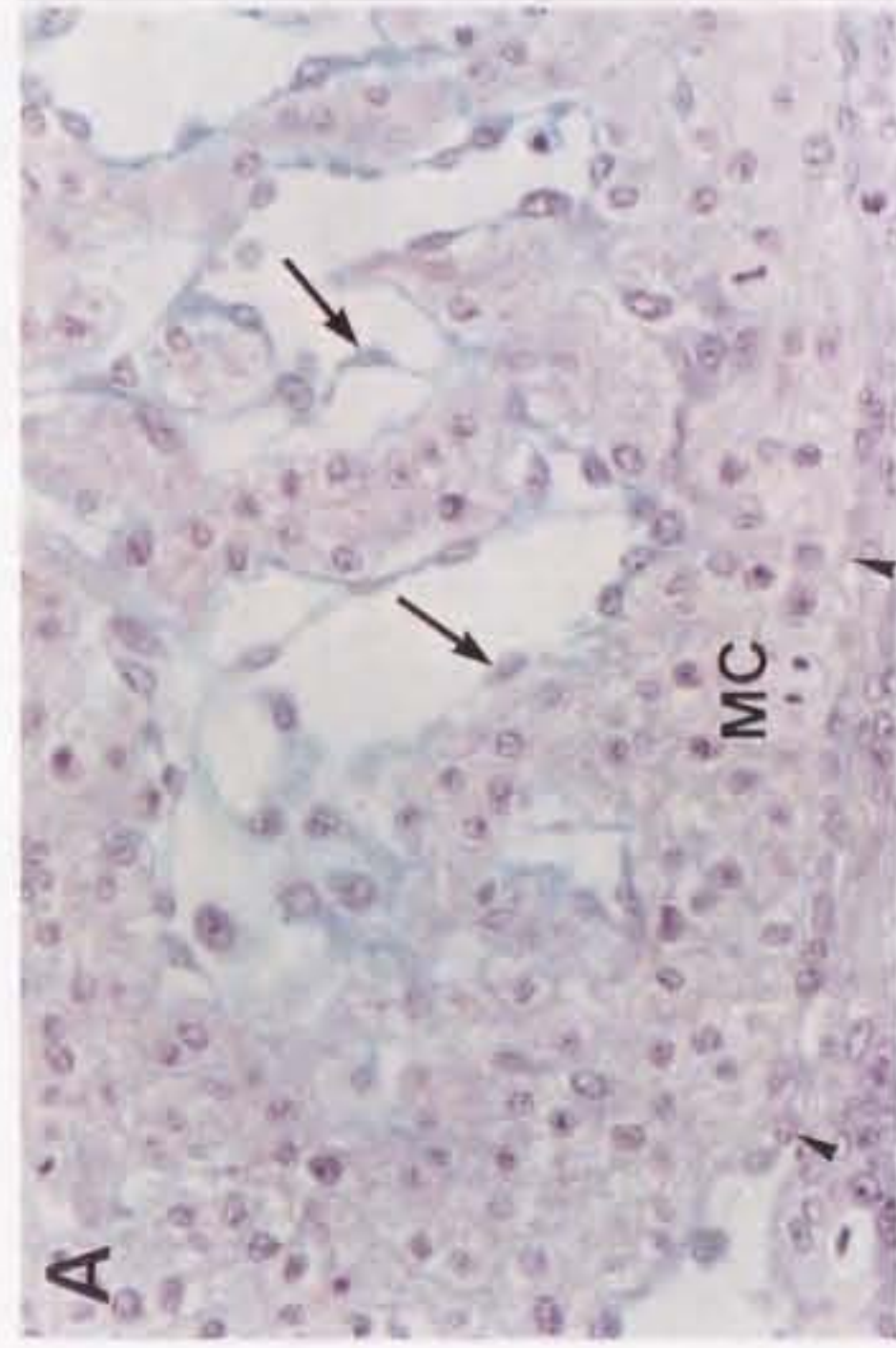
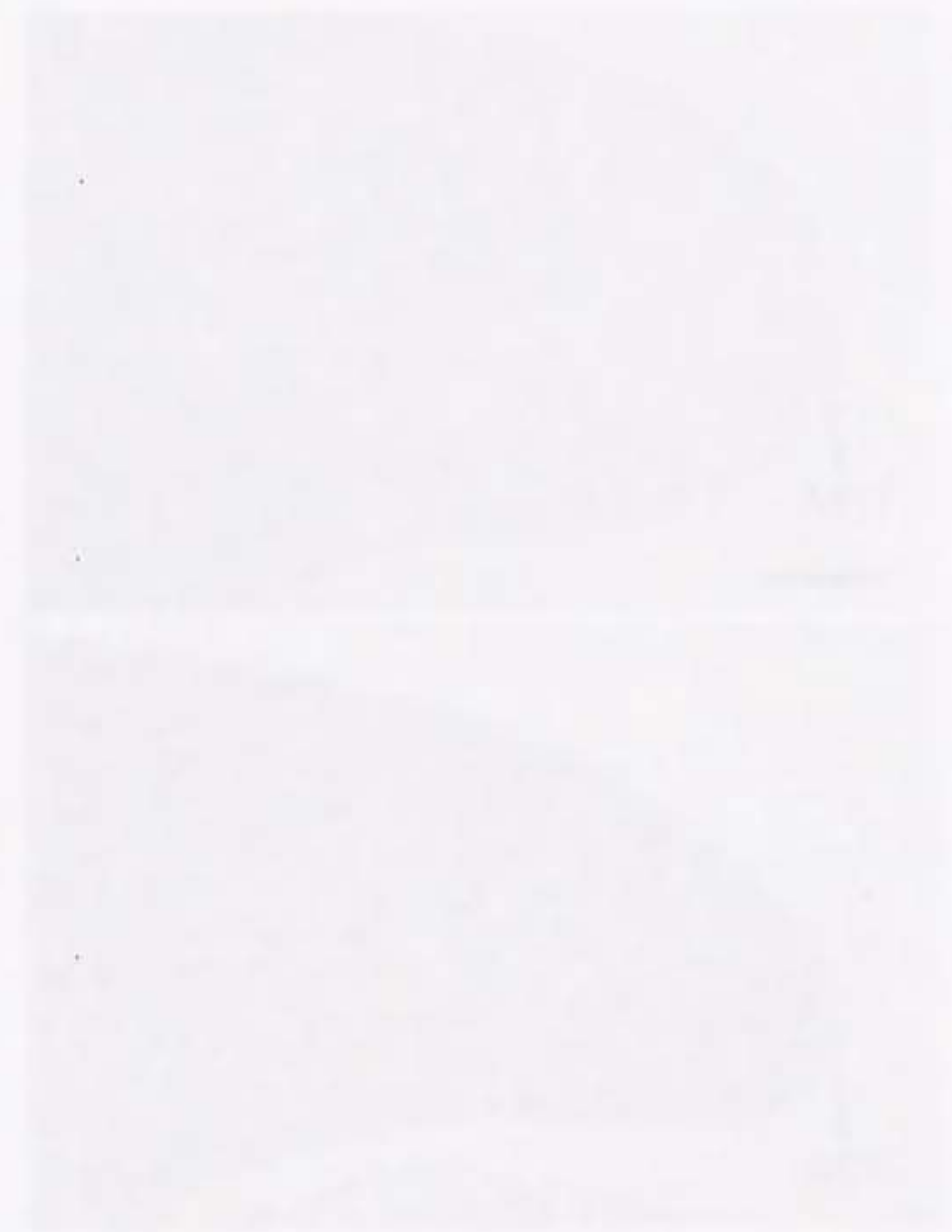


図 5 - 5. 枝芽の形態の比較。A が野生型、B が変異体。変異体では細胞密度が高くなっており、しかもアルシアンブルーで良く染まっているため、全体に色が濃く見える。変異体でも A E R はあるが、間充織側に丸く落ち込んでいるなど、形態に異常がある。棒線は、100 μ m を表す。A E R ; 外胚葉性頂堤。



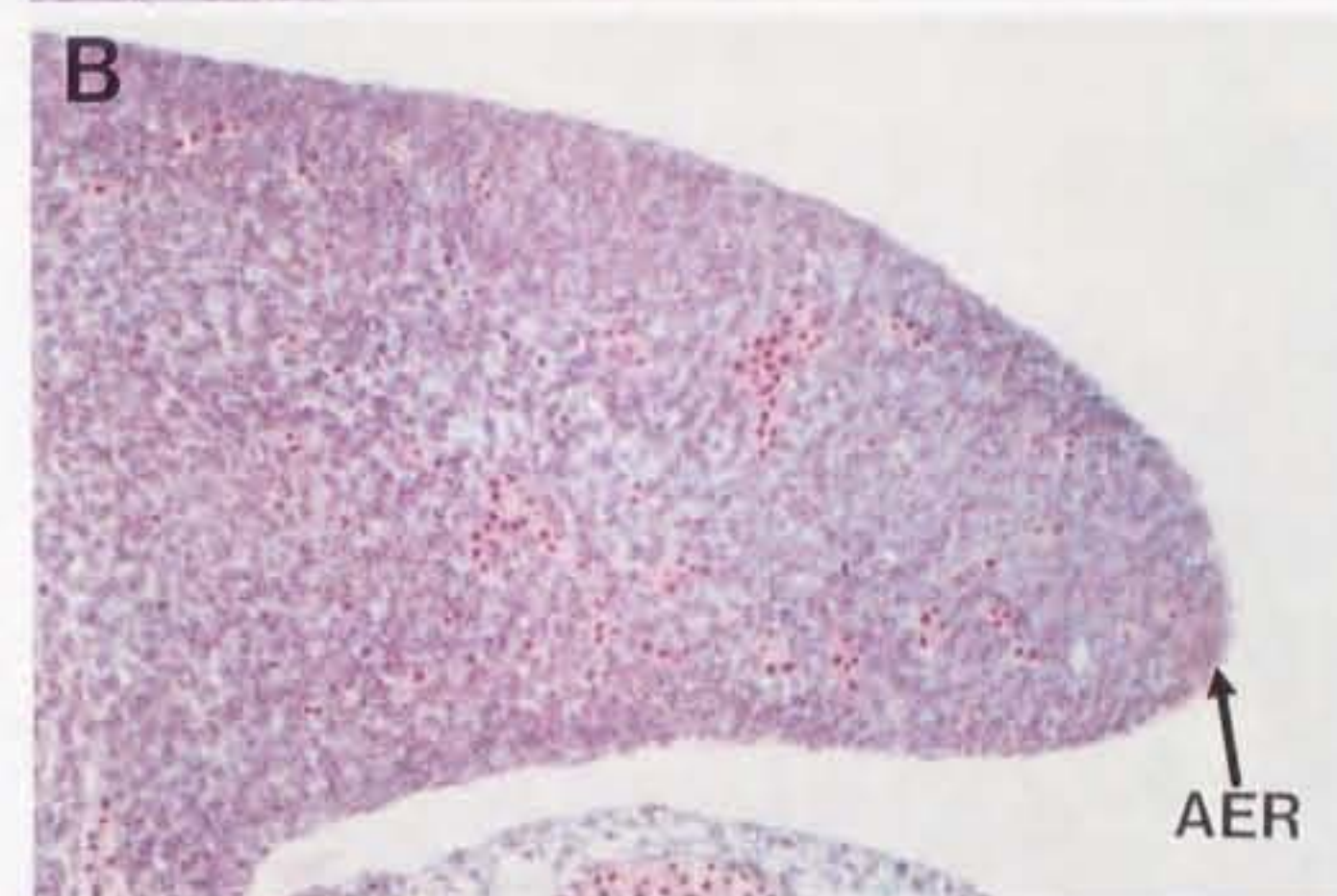
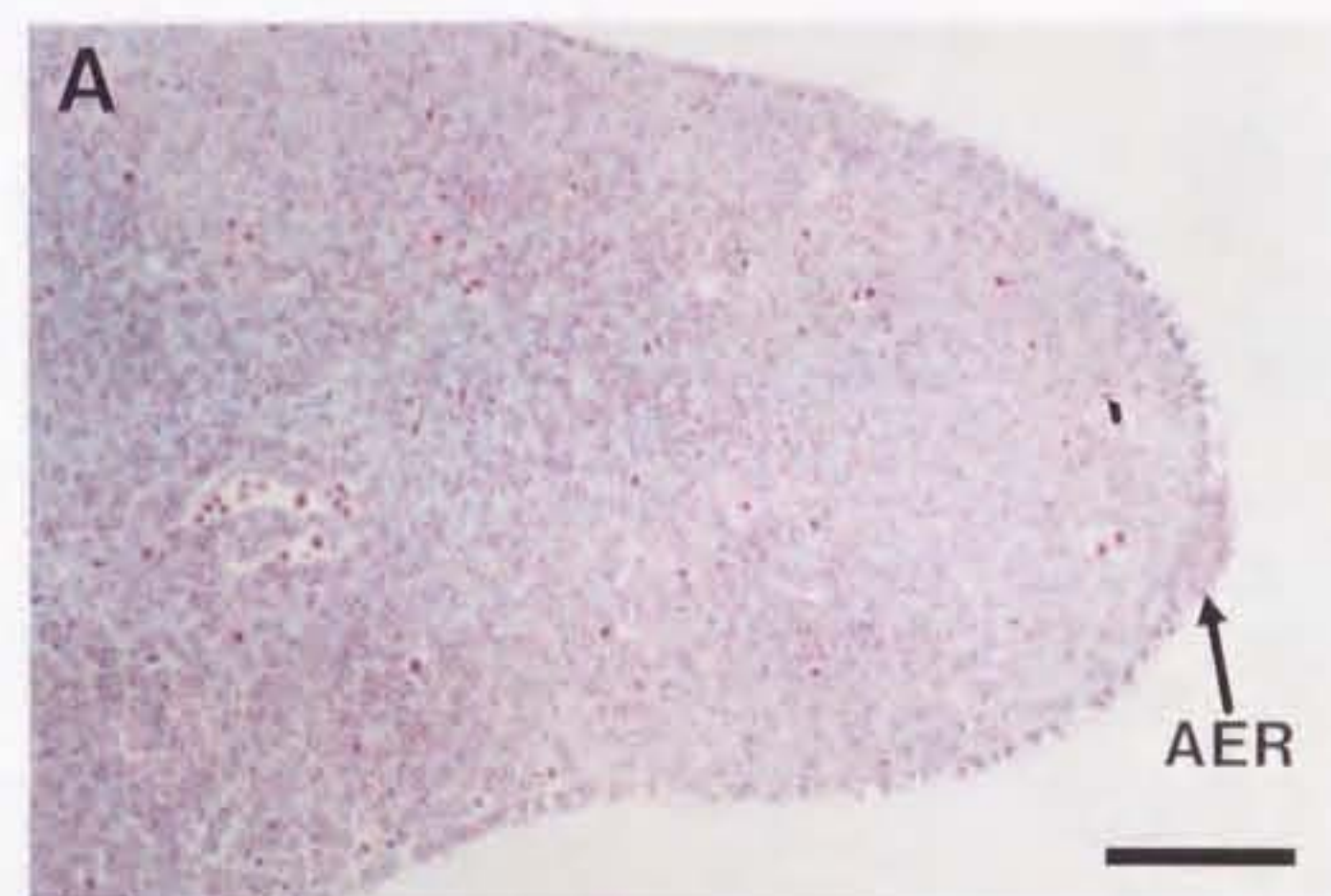


図 6 - 1. N - m y c 遺伝子の構造。枠線内はエクソンを示す。黒い部分はタンパク質をコードしている領域。

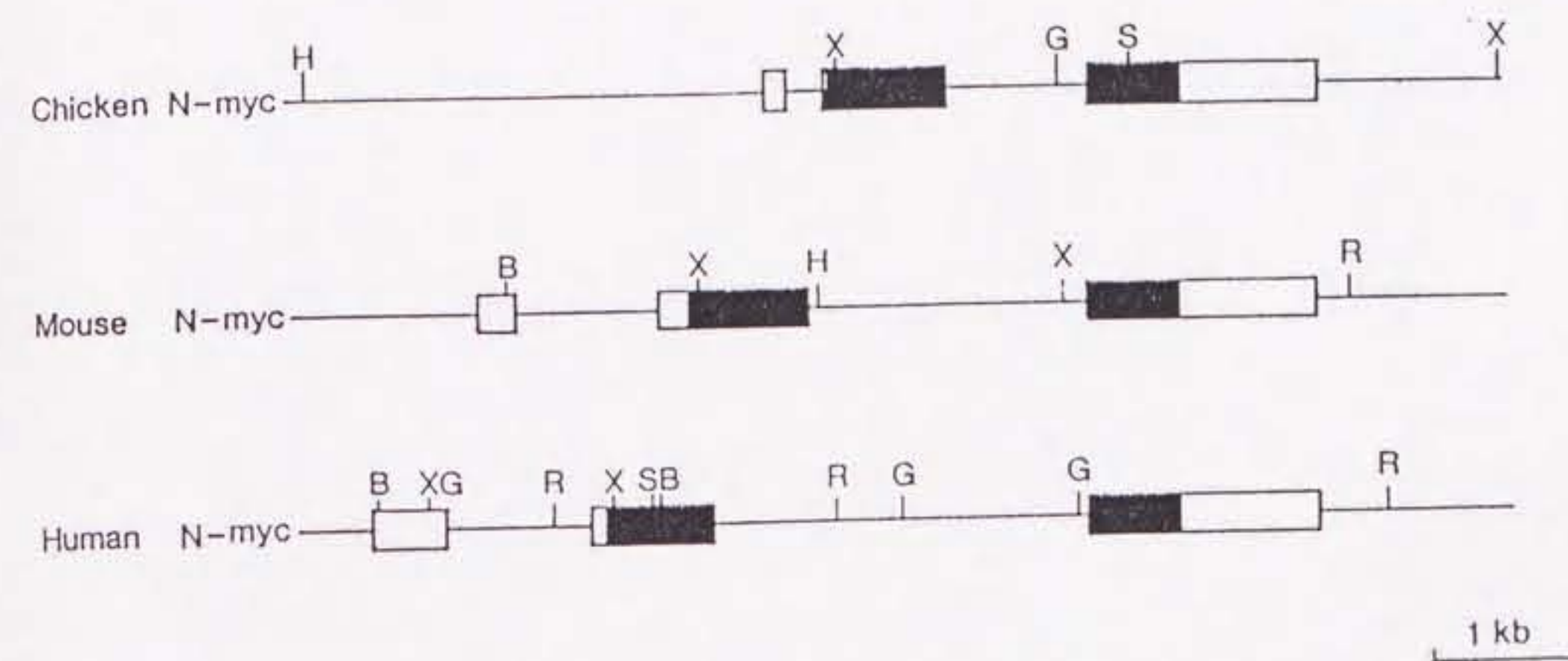
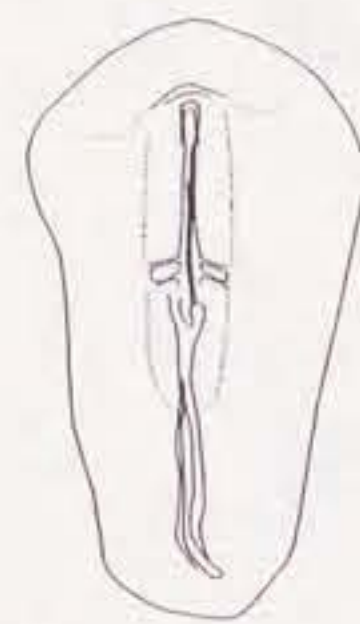


図6-2. Hamburger & Hamiltonによるニワトリ胚の発生段階。本文中に登場したStageのみ示した。倍率：Stage 7：×9.5、Stage 12~14、17~20：×9.1、Stage 21：×7.2、Stage 24：×3.8、Stage 26：×5.1、Stage 29：×3.2、Stage 31：×2.5、Stage 36：×1.6、Stage 38：×1.5、Stage 40、42：×0.9。



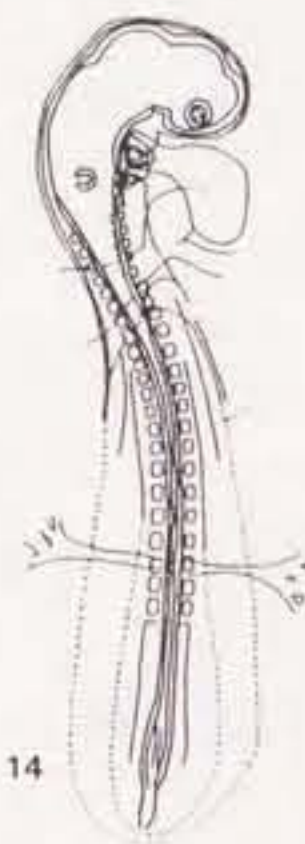
7



12



13



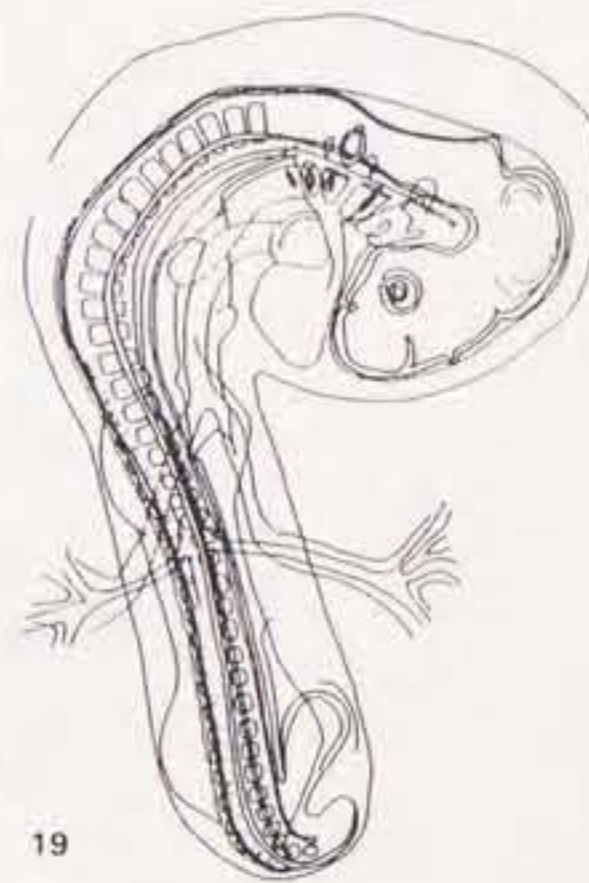
14



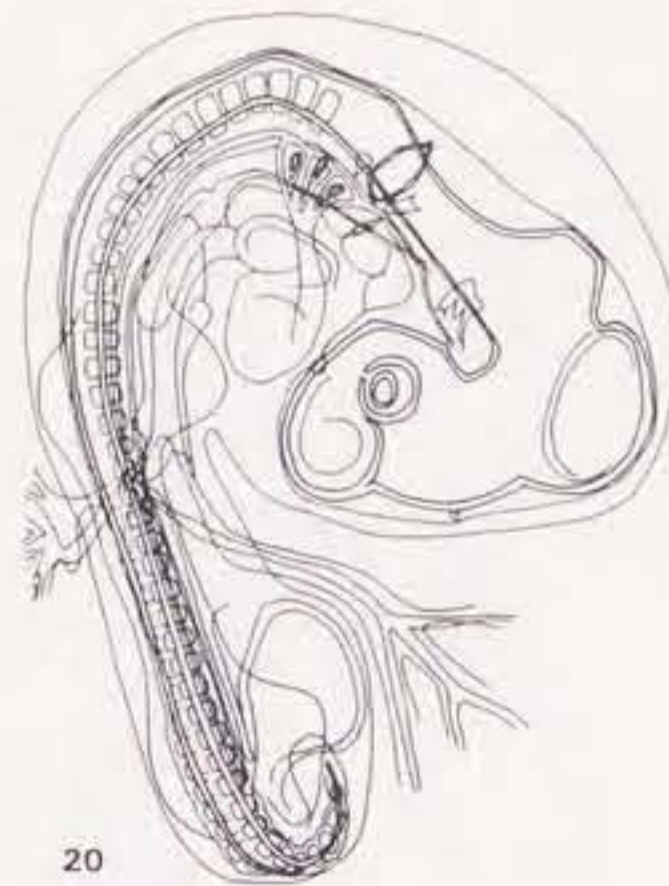
17



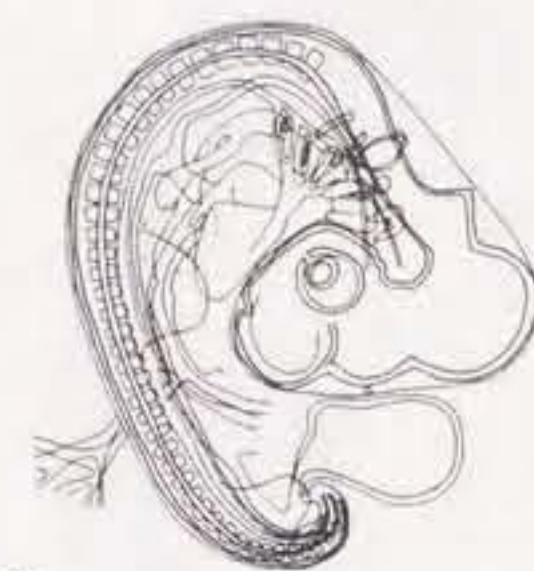
18



19

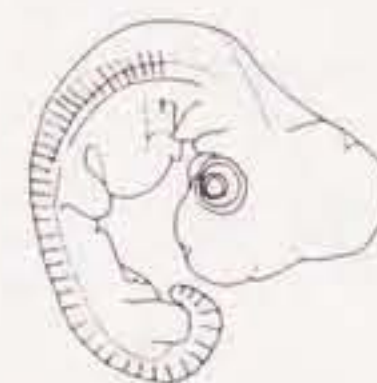


20

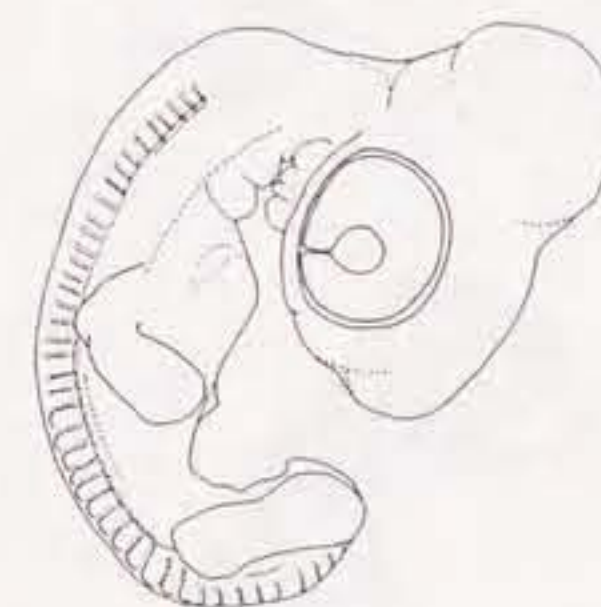


21

前肢芽
後肢芽



前肢芽 後肢芽
24



26

前肢
後肢



29

前肢 後肢



31

前肢 後肢



36



38



40



42

謝 辞

本研究を行うに当たって終始指導していただいた、近藤寿人博士に深く感謝いたします。人の持ち味を生かした研究方針の決定や、具体的な実験手技に対する理解、研究発表の上手なやり方に至るまでの細部に至る先生の配慮は、今後の私の研究者生活にとって大きな糧と成ることでしょう。

また、実際に実験の指導をし、内容の濃い議論に加えて下さった研究室のスタッフの方々や、加藤和人、沢井昭司両博士先輩方にも感謝の意を表します。そして、その優れた実験手技と女性らしい気配りでもって実験のサポートをしてくれた、渡辺祐子さんにも感謝します。本研究の一部は、彼女との共同作業によって行われたものです。なお、抗原に用いた合成ポリペプチドを作製するについては、分子生物第2講座の野崎直仁さんに協力していただきました。また、論文作製にあたっては、第7講座の藤沢肇先生に大変貴重な助言を頂きました。どうも有り難うございました。

そして、時には励ましあい、時には愚痴をこぼし合いながら共に研究してきた、下野明彦君他の研究室のみなさんの存在もまた、私にとってとても大切なことだったと言えます。よって謹んでお礼を述べたいと思います。どうも有り難うございました。

(参考文献)

Adamson, E. D. (1987). Oncogenes in development. *Development*, 99, 449-471.

Akeson, R. and Bernards, R. (1990). N-myc downregulates neural cell adhesion molecule expression in rat neuroblastoma. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2012-2016.

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988a). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF κ -B transcription factor. *Cell*, 53, 211-217.

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988b). I κ -B: a specific inhibitor of the NF κ -B transcription factor. *Science*, 242, 540-546.

Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D. and Ross, J. (1992). Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Develop.* 6, 642-654.

Bishop, J. M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 301-354.

Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N. and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*, 250, 1149-1152.

Blackwood, E. M. and Eisenman, R. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 251, 1211-1217.

Blank, V., Kourilsky, P. and Israël, A. (1992). NF κ -B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *TIBS*, 17, 135-140.

Capobianco, A. J., Simmons, D. L. and Gilmore, T. D. (1990). Cloning and expression of chicken c-rel cDNA: unlike p59^{v-src}, p68^{c-rel} is a cytoplasmic protein in chicken embryo fibroblast. *Oncogene*, 5, 257-266.

Collum, R. G., Clayton, D. F. and Alt, F. W. (1991). Structure and expression of canary myc family genes. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1770-1776.

Dang, C. V. and Lee, W. M. F. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2477-2486.

DePinho, R. A., Legouy, E., Feldman, L. B., Kohl, N. E., Yancopoulos, G. D. and Alt, F. W. (1986). Structure and expression of murine N-myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1827-1831.

Downs, K. M., Martin, G. R. and Bishop, J. M. (1989). Contrasting patterns of myc and N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo. *Genes Dev.* 3, 860-869.

Duband, J.-L. and Thiery, J. P. (1990). Spatial and temporal distribution of vinculin and talin in migrating avian neural crest cells and their derivatives. *Development*, 108, 421-433.

Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I. and White, A. H. (1990). Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature*, 348, 308-312.

Gusse, M., Ghysdal, J., Evan, G., Soussi, T. and Mèchali, M. (1989).

Translocation of a store of maternal cytoplasmic c-myc protein into nuclei during early development. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5395-5403.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). a series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88, 49-92.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Hirning, U., Schmid, P., Schulz, W.A., Rettenberger, G. and Hameister, H. (1991). A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mechan. Develop.* 33, 119-126.

Hirvonen, H., Sandberg, M., Kalimo, H., Hukkanen, V., Vuorio, E., Salmi, T.T. and Alitalo, K. (1989). The N-myc proto-oncogene and IGF-II growth factor mRNAs are expressed by distinct cells in human fetal kidney and brain. *J. Cell Biol.* 108, 1093-1104.

Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. pp.228-242. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.

Ide, H. (1990). Growth and differentiation of limb bud cells in vitro: Implications for limb pattern formation. *Develop. Growth Differ.* 32, 1-8.

Ikegaki, N., Bukovsky, J. and Kennett, R.H. (1986). Identification and characterization of the NMYC gene product in human neuroblastoma cells by monoclonal antibodies with defined specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5929-5933.

Izpisua-Belmonte, J.-C. and Duboule, D. (1992). Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Develop. Biol.* 152, 26-36.

Jacobovitz, A., Schwab, M., Bishop, M. and Martin, G. R. (1985). Expression of N-myc in teratocarcinoma stem cells and mouse embryos. *Nature*, 318, 188-191.

Jaffredo, T., Vandenbunder, B. and Dieterlen-Lievre, F. (1989). In situ study of c-myc protein expression during avian development. *Development* 105, 679-695.

Kato, K., Kanamori, A. and Kondoh, H. (1990). Rapid and transient decrease of N-myc expression in retinoic acid-induced differentiation of OTF9 teratocarcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 486-491.

Kato, K., Kanamori, A., Wakamatsu, Y., Sawai, S. and Kondoh, H. (1991). Tissue distribution of N-myc expression in the early organogenesis period of the mouse embryo. *Develop. Growth Differ.* 33, 29-36.

Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S., Gilbert, F. and Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*, 35, 359-367.

Lüscher, B., Kuenzel, E. A., Krebs, E. G. and Eisenman, R. N. (1989). Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J.* 8, 1111-1119.

Lüscher, B. and Eisenman, R. N. (1990). New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes Develop.* 4, 2025-2035.

Mäkelä, T. P., Koskinen, P. J., Västrik, I. and Alitalo, K. (1992). Alternative forms of Max as enhancers or suppressors of Myc-Ras cotransformation. *Science*, 256, 373-376.

Miyata, Y. and Yahara, I. (1991). Cytoplasmic 8S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J. Biol. Chem.* 266, 8779-8783.

Moens, C. B., Auerbach, A. B., Conlon, R. A., Rossant, J. (1992). A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Develop.* 6, 691-704.

Mugrauer, G., Alt, F. W. and Ekblom, P. (1988). N-myc proto-oncogene expression during organogenesis in the developing mouse as revealed by in situ hybridization. *J. cell Biol.* 107, 1325-1335.

Mugrauer, G. and Ekblom, P. (1991). Contrasting expression patterns of three members of the myc family of protooncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J. Cell Biol.* 112, 13-25.

Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tanimura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S. and Saito, T. (1991). Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature*, 350, 83-86.

Prendergast, G. C., Lawe, D. and Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homologue of Max, with c-myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*, 65, 395-407.

Roth, S., Stein, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 59, 1189-1202.

Roux, P., Blanchard, J.-M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P. and Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell*, 63, 341-351.

Rushlow, A., Han, K., Manlay, J. L. and Levine, M. (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell*, 59, 1165-1177.

Sanchez, E. R. (1992). Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 17-20.

Sawai, S., Kato, K., Wakamatsu, Y. and Kondoh, H. (1990). Organization and expression of the chicken N-myc gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2017-2026.

Sawai, S., Shimono, A., Hanaoka, K. and Kondoh, H. (1991). Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New Biologist*, 3, 961-969.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. L., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 305, 245-248.

Sejersen, T., Bjorklund, H., Sumegi, J. and Ringertz, N. (1986). N-myc and c-src genes are differentially regulated in PCC7 embryonal carcinoma

cells undergoing neuronal differentiation. *J. Cell. Physiol.* 127. 274-280.

Shenefelt, R.E. (1972). Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: Relation of dose and stage at treatment. *Teratology*, 5. 103-118.

Slamon, D. J., Boone, T. C., Seeger, R. C., Keith, D. E., Chazin, V., Lee, H. C. and Souz a, L. M. (1986). Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene. *Science*, 232. 768-772.

Steward, R. (1989). Relocation of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell*, 59. 1179-1188.

Suemori, H., Kadokawa, Y., Goto, K., Araki, I., Kondoh, H. and Nakatsuji, N. (1990). A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation un early embryos and ubiquitous β -galactosidase expression. *Cell Differ. Develop.* 29. 181-186.

Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L. and Lee, J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of polarizing region. *Nature*, 296. 564-566.

Tickle, C., Crawley, A. and Farrar, J. (1989). Retinoic acid application to chick wing buds leads to a dose-dependent reorganization of the apical ectodermal ridge that is mediated by the mesenchyme. *Development*, 106. 691-705.

Ueno, K., Kato, K. and Kondoh, H. (1988). Subnuclear localization and antitransforming activity of N-myc: β -galactosidase fusion proteins. *Mol.*

Cell. Biol. 8, 4529-4532.

Varmus, H. E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* 18, 53-612.

Vize, P. D., Vaughan, A. and Krieg, P. (1990). Expression of the N-myc proto-oncogene during the early development of *Xenopus laevis*. *Development*, 110, 885-896.

Wakamatsu, Y. and Kondoh, H. (1990). Conditions for detection of embryonic N-myc expression by in situ hybridization. *Acta. Cytochem. Histochem.* 23, 367-374.

Wenzel, A., Cziepluch, C., Hamann, U., Schürmann, J. and Schwab, M. (1991). The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J.* 10, 3703-3712.

Wharton, R. P. and Struhl, G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell*, 67, 955-967.

Whitesell, L., Rosolen, A. and Neckers, L. M. (1991). Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1360-1371.

Whiting, J., Marshall, H., Cook, M., Krumlauf, R., Rigby, P. W. J., Stott, D. and Allemann, R. K. (1991). Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of Hox-2.6 gene expression. *Development*, 112, 279-287.

Yamada, S., Ikeda, M. and Eto, K. (1992). Differential expression of c-myc and N-myc during oral organogenesis of the mouse embryo. *Differ. Growth Develop.* 34, 239-251.

