

脊椎動物胚での峽部オーガナイザー形成制御機構の研究

2013年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教員 弥益 恭）

中山 由紀子

# 目次

目次	1
要旨	2
序論	4
材料と方法	8
結果	20
考察	38
謝辞	49
参考文献	50
図の説明	57
図表	

## 要旨

脊椎動物の中樞神経系は、発生の進行に従って前後、背腹の軸に沿って部域化され、最終的に極めて複雑な構造とそれに対応する高次機能を獲得する。初期脳形成では二次オーガナイザーが脳の部域化において重要な働きをしており、中脳及び小脳の発生運命の決定とパターン形成に関しては中脳後脳境界 (Midbrain-Hindbrain boundary, MHB) 及びそこに形成される峽部が重要な役割を担う。従って、MHB・峽部形成の制御機構の解明は、脊椎動物における脳形成を理解する上で重要な課題といえる。これに関し、後脳前方に発現する *gbx2* ホメオボックス遺伝子は、予定前・中脳で発現する *otx2* 遺伝子とともに MHB の確立とその後の発生を制御することが、魚類から哺乳類まで共通して知られる。MHB の位置決定の後、ここに多数の MHB 関連遺伝子の発現が誘導されるが、*Gbx2* タンパク質の作用機構、及びその下流標的遺伝子についての知見は乏しい。また、*gbx2* は発生後期まで MHB 周辺で発現を持続させるが、各発生段階での機能の違いについても知られていない。本研究では、*Gbx2* の機能解析を通して MHB における遺伝子ネットワークを解明することを目的とし、*Gbx2* の脳形成における機能、*Gbx2* タンパク質内部の機能領域構造、発生の進行に伴う活性の変化、及び下流標的遺伝子について、ゼブラフィッシュをモデルとして検討を試みた。

まず、*gbx2* の発現レベルが脳形成に及ぼす影響を検討するため、異なる量の mRNA を胚に導入し、その効果を形態及び分子マーカー発現により検討を行った結果、*gbx2* は高レベルでは以前に観察されたとおり前脳及び中脳の形成を広範に阻害するのに対し、低レベルでは峽部形成のみを阻害することを見出した。これは、*gbx2* が峽部の形態形成に特異的に関与することを示す初めての Gain-of-function 実験である。次に、*Gbx2* の転写調節能を検討するため、野生型 *gbx2*、人工的に作製した転写活性化型 *Gbx2* 遺伝子 (*vp-gbx2*)、転写抑制型 *Gbx2* (*en-gbx2*) について、mRNA を胚に導入し、強制発現胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を異なる発生段階で検討したところ、*gbx2* と *en-gbx2* は共に前・中脳抑制活性を示したのに対し、*vp-gbx2* は中脳から峽部にかけての形態異常を起こした。*Gbx2* の転写調節能をさらに検討するため、ゼブラフィッシュ *fgf8a* 遺伝子の MHB エンハンサー配列の制御下に置いたホタル luciferase 遺伝子をレポーター、*gbx2*、*vp-gbx2*、*en-gbx2* をエフェクターとして P19C6 細胞及び HEK293T 細胞へ共導入し、luciferase の発現を検討した結果、*gbx2* と *en-gbx2* は MHB エンハンサーを抑制し、*vp-gbx2* は活性化した。また、このエンハンサー活性は *pax2a* により上昇するが、この活性も *gbx2* により抑制された。以上の結果から、*Gbx2* は転写抑制因子であると結論した。

次に、ゼブラフィッシュ *gbx2* について作製した様々な欠失導入遺伝子の mRNA を胚に導入し、強制発現胚の形態と各種脳領域マーカー遺伝子の発現を検討した。その結果、*Gbx2* の前・中脳抑制活性にはホメオドメインが不可欠であること、N 末領域及び C 末領域いずれもが前・中脳形成抑制活性を持つことが見出された。また、各種脊

椎動物 **Gbx2** と同様 **N** 末領域に存在する **Eh1** 様配列も **Gbx2** の前・中脳抑制活性に関与すること、やはり他種でも保存されている高プロリン含有配列 (高 **Pro** 配列) が背腹パターンニングに関わることが示唆された。興味深いことに、**Eh1** 様配列と **Pro** 配列に挟まれた介在配列 (**IVR** 配列) を欠失させた **Gbx2** を強制発現すると、峽部が欠損するとともに中脳領域が小脳の性質を帯びることが観察された。これらの結果は、**Gbx2** の脳形成制御能が異なる機能を持つ複数の分子内配列に依存することを示唆する。

さらに、発生時期ごとに **Gbx2** の機能を検討するため、熱誘導性プロモーター制御下に **gbx2** を組み込んだ人工遺伝子 (**hsp-gbx2**) を導入した胚、または染色体上にこの遺伝子が組み込まれたトランスジェニック胚 (**Tg:hsp-gbx2** 胚) に対して、異なる発生時期に加温処理で **gbx2** の発現を誘導し、処理胚の形態と各種脳領域マーカーの発現を検討した。その結果、**Gbx2** は原腸形成終了期において **MHB/峡部** 形成に対して顕著な抑制活性を持つが、それ以前の原腸形成期にはその活性が弱く、原腸形成終了期を過ぎると急速に活性は低下することが示唆された。このことは、**Gbx2** は主として原腸形成終了前後に **MHB/峡部** 形成に関わることを示す。

最後に、**MHB/峡部** 形成における **Gbx2** 下流標的遺伝子を網羅的に探索するため、**Tg:hsp-gbx2** 胚を原腸形成終了期で加温処理して **gbx2** を強制発現させ、直後に **RNA** を回収して対照胚との発現の異なる遺伝子についてマイクロアレイ解析により網羅的に検討した。その結果、多数の脳形成関連遺伝子の発現変動が確認されたが、**Tg:hsp-gbx2** 胚での発現をさらに *in situ hybridization* 法、定量的 **PCR** 法で遺伝子ごとに検討した結果、有力な下流標的遺伝子の絞り込みに成功した。

以上一連の研究により、脊椎動物の中脳・小脳領域の形成について、**Gbx2** 転写因子を中心とした新たな分子的制御機構の解明を行った。

## 序論

脊椎動物の中樞神経系、特に脳の形成制御機構の解明は、脊椎動物脳の持つ高度の情報処理機能を理解する上で極めて重要な研究課題である。脳は、発生初期に生じる神経外胚葉が複雑な領域化を重ねる結果として形成される。胞胚期における中胚葉誘導により、胚背側に一次オーガナイザー領域 (ゼブラフィッシュでは胚盾; **Embryonic shield**) が生じるが、ここから分泌される **Noggin**、**Chordin** などによって **BMP** シグナルが阻害されることで、背側外胚葉は神経組織となる (**Schier and Talbot, 1998**)。神経誘導の結果生じる神経板では引き続き、**FGF** シグナル、**Wnt** シグナル、そして **retinoic acid** 等の後方化シグナルにより前後に沿ったパターンニングが起きる (**Blumberg et al., 1997**)。最も初期に観察される脳の形態的な領域化は、前後軸に沿った 3 つの一次脳胞 (前脳胞・中脳胞・後脳胞) の形成であり、その後、前脳胞からは終脳と間脳、後脳胞からは小脳と菱脳が形成される。

神経板、神経管においてこれらのパターンニングや領域化が整然と進行するにあたり、神経板内で新たに生じるシグナルセンター (二次オーガナイザー領域) の重要性が知られている。例えば、前脳前方の形成誘導には前脳前端 (**Anterior neural region, ANR**) または前方神経境界 (**Anterior neural boundary, ANB**) が働くことが各々マウスとゼブラフィッシュを用いた実験で示されている。マウス胚の前方神経管のみを組織培養しても前脳は形成されないが、脊索前板を共培養すると前脳形成が誘導された (**Rubenstein et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997**)。ゼブラフィッシュでは、前方外胚葉細胞を除去すると終脳が欠損し、後方へ移植すると異所的な終脳が誘導された (**Houart et al., 1998**)。一方、中脳と後脳の境界領域 (**Midbrain-hindbrain boundary, MHB**) の機能に関しては、当初、ニワトリとウズラを用いた移植実験で明らかにされた。まず、間脳を中脳後方に移植すると視蓋に分化し、この異所的視蓋も視神経の投射を受けること、そして、中脳に異所的に移植した視蓋の吻尾軸 (前後軸) が宿主本来のものと胸像関係にある事が報告された (**Itasaki et al., 1991; Nakamura et al., 1986**)。また、中脳胞を前後軸方向に逆転して移植すると、間脳に異所的な中脳が形成されること (**Martinez and Alvarado-Mallart, 1990**)、峡部を予定前脳に移植すると異所的な中脳が、後脳領域に移植すると異所的な小脳が誘導されることが報告された (**Gardner and Barald, 1991; Martinez et al., 1991**)。これらの結果から、**MHB** には中脳及び小脳形成の誘導とパターンニングに関わるシグナルセンターとされている (**Liu and Joyner, 2001; Rhinn and Brand, 2001**)。

**MHB** の形成と機能には、数多くの遺伝子が関わるということがマウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの研究で明らかとなった。**MHB** 周辺で発現する遺伝子として、ショウジョウバエ *wingless* の脊椎動物ホモログ *Wnt1* や *Engrailed* ホモログの *En*、ペアードボックス型転写因子遺伝子 *Pax* ファミリー、繊維芽細胞増殖因子遺伝子 *Fgf8* などがある。これら **MHB** 特異的遺伝子各々の機能については、機能欠失型変異体マウスを用いて詳細に検討されており、*Wnt1* 突然変異 (**McMahon et al.,**

1992)、*En-1/2* の 2 重変異 (Song and Joyner, 2000)、*Pax2/5* の 2 重変異 (Urbánek et al., 1997)、*Fgf8* の hypomorph 変異 (Meyers et al., 1998) ではいずれも中脳から後脳にかけて大規模な欠損が見られた。

ゼブラフィッシュにおいても、峡部異常に着目した大規模変異体スクリーニングから MHB 関連遺伝子の突然変異が同定されている。*pax2a* (ゼブラフィッシュでの *Pax2* 相同遺伝子) に変異が起きた *no isthmus (noi)*; Lun and Brand, 1998) 胚においては、眼柄や内耳の異常に加え、中脳及び小脳の欠損が見られる。また、*Fgf8* のゼブラフィッシュ相同遺伝子である *fgf8a* の変異体 (*acelebellar/ace*) 胚でもやはり MHB 領域の異常がみられる (Brand et al., 1996; Reifers et al., 1998)。*ace* は点突然変異による *fgf8a* の機能欠失型変異であり、*ace* 胚では形態的に峡部の欠損と耳胞の縮小が観察されるが、この胚では *pax2a* 及び *pax8*、*spry4*、*ephA3* などの MHB 発現遺伝子が消失する一方、中脳で発現する *otx2*、*wnt4*、*dmbx1* の発現が後方へ拡大することから、中脳の後方への肥大と小脳前方の欠損が起こっているとされる (Jászai et al., 2003)。この他、ゼブラフィッシュ class V POU 遺伝子 *pou2/pou5f1* に変異が起きた *spiel ohne grenzen (spg)*; Burgess et al., 2002) 胚では峡部の欠損、耳胞及び尾部の縮小、接触刺激への応答異常が見られた。class V POU の脳形成への関与は他種では知られておらず、注目される。近年、microRNA が峡部形成に関与するという報告もあり (Leucht et al., 2008)、非常に多彩な遺伝子群の相互作用によって MHB が維持されていることが明らかとなってきた。

MHB の形成と機能発現は原腸形成後期から体節形成初期に進行するが (Rhinn and Brand, 2001)、それに先立って原腸形成初期に MHB の位置決定に関わるとされるのがホメオボックス遺伝子の *Otx2* と *Gbx2* である。*Otx2* は様々な動物種で前方形成に関わる遺伝子であり (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993)、脊椎動物胚では、原腸形成初期には前方神経外胚葉で広く発現するが (Li et al., 1994)、後期原腸形成期以降、明瞭な後方発現境界を持つようになる。*Otx2* null 変異体マウスでは第 3 菱脳節までの前方脳領域が欠損し (Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995)、*Otx2* が前方脳領域の形成に必須であることを示している。

一方、*Gbx2* 遺伝子も、これまでにヒト (Lin et al., 1996)、マウス (Bouillet et al., 1995)、ニワトリ (Kowenz-Leutz et al., 1997)、ツメガエル (Von Bubnoff et al., 1996)、そしてゼブラフィッシュ (Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2003) など、多くの脊椎動物で同定されている。*Gbx2* はマウスやニワトリの場合、初期原腸期から後方神経板で広く発現するが (Bouillet et al., 1995; Niss and Leutz, 1998)、その後前方神経板での *Otx2* の発現と接してその後方で発現するようになる。マウスでは *Gbx2* 変異体が作製されており、null 変異体胚で後脳前方の欠損が見られている (Wassarman et al., 1997; Waters and Lewandoski, 2006)。

*Otx2* を後脳前方に異所的に発現させたノックインマウスでは、新たに生じた *Otx2* の発現後端に従って、MHB 遺伝子の発現領域も後方へシフトした (Broccoli et al., 1999)。*Gbx2* を中脳後方に異所的に発現させたノックインマウスでは、*Gbx2* の発現前端とともに MHB 遺伝子の発現が前方へシフトしており (Millet et al., 1999)、マ

ウスでは、原腸形成における *Otx2* と *Gbx2* の発現境界がその後の MHB の位置を決定すると考えられている。

なお、ゼブラフィッシュの場合、*gbx2* の発現は原腸形成終了期以降であり、それ以前は *gbx1* が原腸形成初期から後方神経外胚葉に発現する (Kikuta et al., 2003; Rhinn et al., 2003)。これに関し、ゼブラフィッシュにおいて、原腸形成期に MHB の決定を行うのは *gbx1* であり、*gbx2* はその後の MHB の維持や峡部構造の形成に関与するとされている (Kikuta et al., 2003)。

*Gbx2* 自体はホメオドメインを持つことから転写因子と予想されるが、その機能の詳細は不明である。転写調節における役割については、*Gbx2* ホメオドメインと *Drosophila Engrailed* 転写抑制領域 (EnR) もしくは単純ヘルペスウィルスの転写因子 VP16 の転写活性化領域 (VP16) を融合させたキメラ遺伝子の強制発現実験が *Xenopus* で行われており (Tour et al., 2002)、この結果から *Gbx2* は転写抑制に働くとされる。しかしその一方で、ニワトリの myeloblast 培養系 (Kowenz-Leutz et al., 1997)、ヒトの胎児腎細胞 (Roeseler et al., 2012) においては転写活性化に働くという報告もあり統一的な理解はまだない。

また、胚発生における機能については、ゼブラフィッシュ胚 (Kikuta et al., 2003)、あるいは *Xenopus* 胚 (Tour et al., 2002) で *Gbx2* を強制発現すると前脳及び中脳が欠損することから、この遺伝子には前・中脳形成抑制の活性があるとされるが、その作用機能についても知見が少ない。ゼブラフィッシュにおいては、N 末領域 (N-terminal region, NTR) 又は C 末領域 (C-terminal region, CTR) を欠失させた *Gbx2* を強制発現した結果から、*Gbx2* の機能活性は NTR と CTR いずれにも不完全ながら存在することが示唆された (菊田, 2003)。また、メダカ胚を用いた実験より、*Gbx2* 内にあり、一般に *Groucho* との相互作用により転写抑制に働くとされる Eh1 様配列が、*Gbx2* の *Otx2* 抑制活性に関与するという報告があるが (Heimbucher et al., 2007)、*Gbx2* で知られるその他の種間保存配列 (Kikuta et al., 2003) の機能については明らかになっていない。

*Gbx2* の峡部形成との関わりについては主として遺伝子機能阻害実験で示されており、*Gbx2* が実際にいつ機能しているかについても詳細は不明である。*Gbx2* の時期特異的な効果については、ゼブラフィッシュ胚 (金井, 2003) 及び *Xenopus* 胚 (Tour et al., 2002) で、ホルモン誘導型 *Gbx2* を用いて検討されており、ゼブラフィッシュについては金井により、*Gbx2* の前・中脳抑制効果は原腸形成期では高く、体節形成期以降は低下することが示唆された。*Xenopus* においても、同様の効果は胞胚期から原腸胚期では高く、神経胚期以降は発生が進むに従って低下することが示されている (Tour et al., 2002)。しかしながら、詳細な経時的解析、そして各発生段階での作用機構の解析は行われていない。

本研究では、*Gbx2* の作用機構の詳細を明らかにするため、ゼブラフィッシュ胚において、*Gbx2* の脳形成に及ぼす効果についての詳細な再検討を行うと共に、*Gbx2* の転写調節活性、そして分子内機能領域を検討した。また、発生時期ごとの *Gbx2* の機能を明らかにするため、熱誘導性 *gbx2* 遺伝子を利用した遺伝子誘導実験を試み

た上、Gbx2 下流遺伝子についての網羅的解析を行った。



## 材料と方法

### 実験動物

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*; RW 系統) は、水温 27°C において、明期 14 時間、暗期 10 時間の明暗サイクル下で飼育した。ゼブラフィッシュ胚を得る際は、明期の終了する 2-3 時間前に雌雄の成魚を数匹ずつガラス玉の敷き詰められた交配用水槽に移した。翌朝、点灯の 1-2 時間後にサイフォンを用いて胚を吸い上げ、これを網で回収した。特に産卵直後の胚に微小注入 (microinjection) を行う場合、交配用水槽をプラスチック板で半分に仕切り、明期の終了する 2-3 時間前に雌雄数匹ずつを仕切りの両側に入れた。翌朝、点灯の 1-2 時間後に仕切りを除去し、5 分以上経過後に上述のように胚を回収した。回収胚は 23°C、25°C、28.5°C、または 32°C で飼育した。なお、発生段階は Kimmel らに従って表記する (Kimmel et al., 1995)。prim-5 期以降で観察を行う際は、必要に応じて 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Nacalai Tesque; 最終濃度 0.03 mg/mL) を後期原腸形成期より飼育水に添加し、メラニン合成を阻害した。

*fgf8a* 遺伝子の機能欠失変異体 *acerebellar* (*ace*; 筑波大学、小林麻己人博士より供与) を用いる際は (Brand et al., 1996)、成魚集団内でのランダムな交配と子孫胚での *ace* 表現型の出現により、あらかじめヘテロ接合体魚を同定した。*ace* 胚を得る際は、これらのヘテロ接合体を交配させ、峡部の欠損、耳胞の縮小などの形態的異常によりホモ変異体を同定した。

### 培養細胞

培養細胞を用いた reporter assay には、HEK293T 細胞と P19C6 細胞を使用した (理化学研究所・バイオリソースセンターから購入)。細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; High Glucose, with L-Glutamine, Phenol Red, Sodium Pyruvate; Wako) に Fetal bovine serum (FBS; Hyclone) を最終濃度 15% (P19C6) または 10% (HEK293T), Penicillin-Streptomycin (Gibco) を最終濃度 1% となるように加えた培地を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

細胞の継代に当たっては、培地をアスピレーターで吸引後、5 mL PBS で細胞を洗浄した。その後、PBS を除去し、0.25% (w/v) trypsin-1 M EDTA · 4Na Solution with Phenol Red (Wako; 以下 trypsin 液) 300 μL を加え、37°C で 2-3 分間保温し、底面から細胞を遊離させた。この細胞懸濁液に 3 mL の D-MEM with FBS を加え、酵素反応を抑えた後、HEK293T 細胞の場合は 150 μL、P19C6 細胞の場合は 100 μL をとり、D-MEM with FBS 5 mL と混合した。これを、P19C6 細胞の場合は 100 mm Tissue culture dish (BM) または 25 cm<sup>2</sup> OrCap for Flask with Filter Cap (Orange Scientific)、HEK293T 細胞の場合は 60 mm/Collagen-Coated Dish (Collagen Type I; IWAKI) または Collagen Type I-Coated 25 cm<sup>2</sup> Flask (IWAKI) にまいた。この操作を HEK293T 細胞は 3 日毎に、P19C6 細胞は 2-3 日毎に行った。

## 遺伝子工学的手法

培地、大腸菌の培養、プラスミドの調製、ライゲーション、トランスフォーメーション、DNA 及び RNA の泳動は、基本的に Sambrook らに従った (Sambrook et al., 1993)。塩基配列の決定の際は、DTCS Quick Start Master Mix (BECKMAN) あるいは Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、反応産物をそれぞれ CEQ8000 (BECKMAN) または Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) により解析した。配列データの解析には GENETYX-WIN ver.5.0 を用いた。

## 転写活性化型・抑制型 *gbx2* 遺伝子の作製

転写活性化型 *gbx2* 作製の際には、pCS2-VP16-Gbx2HDC (菊田, 2005) を鋳型とし、CTR を挟む逆向きプライマー対 [Gx2dC-s(Pst), Gx2dC-as(Pst); Table 4] を用いて以下のように Inverse polymerase chain reaction (PCR) 反応を行い、元のコンストラクトより CTR を除去した。まず、10 ng 鋳型 DNA, 5  $\mu$ L 5x PrimeSTAR GXL buffer, 1.6  $\mu$ L 2.5 mM each dNTP mix, 各 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M Primer (sense, antisense), 0.2  $\mu$ L PrimeSTAR GXL polymerase (TaKaRa) に滅菌 MQ 水 (以下 MQ 水) を加えて全量を 20  $\mu$ L とし、94°C で 1 分間加熱後、98°C, 10 秒; 63°C, 15 秒; 68°C, 6 分間のサーマルサイクルを 35 回繰り返して増幅した。得られた断片は *Pst*I で消化し、セルフライゲーションにより環状化した (*vp-gbx2*; Fig. 4A)。このコンストラクトでは、NTR の一部とホメオドメイン (+212 aa - +300 aa) が VP16 転写活性化領域の C 末に融合している。

転写抑制型 *gbx2* 作製の際は、pCS-*gbx2* $\Delta$ UTR (Kikuta et al., 2003) を鋳型としてプライマー対 [303AS-E(En), 241S.E2(En); Table 4] と GXL polymerase を用いて PCR 反応を行い、ホメオドメイン領域を増幅した。得られた cDNA 断片の末端を *Xho*I と *Xba*I で消化し、ENG-N(pCS2+) 中の EnR 領域の下流にある *Xho*I-*Xba*I 部位に in frame で挿入した (*en-gbx2*; Fig. 4A)。このコンストラクトでは、ホメオドメイン (+239 aa - +300 aa) が EnR 領域の C 末に融合している。

## *gbx2* 分子内欠失変異体遺伝子の作製

FLAG tag 付加型の *gbx2* (*ft-gbx2*) 遺伝子及びその分子内欠失遺伝子 (*gbx2*-HD、- $\Delta$ N、- $\Delta$ C、-ND; Fig. 13) の発現コンストラクトは以下のように作製した。なお、これらの欠失遺伝子での Gbx2 配列は、以前に作製された Myc tag 付加型 *gbx2* 欠失遺伝子と tag 部位以外は対応しており、以下の PCR では以前と同じ primer を用いている (菊田, 2000)。各コンストラクトがコードするアミノ酸領域と作製に用いたプライマーの名称を Table 3 に、プライマーの配列と *gbx2* cDNA 上の認識配列の位置を Table 4 に示す。

まず、*gbx2* コード領域内の異なる位置に対して作製した sense、antisense プライマーを用い (Table 4)、pCS-*gbx2* $\Delta$ UTR を鋳型として、LA Taq polymerase (ToYoBo) を用いた PCR (LA-PCR) 反応を行なった。1 ng 鋳型 DNA, 5  $\mu$ L 10x LA

Taq buffer, 5  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 8  $\mu$ L 2.5 mM each dNTP mix, 各 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M Primer (sense, antisense) に滅菌水を加えて全量を 49.5  $\mu$ L とし、96°C で 5 分間加温した。そこに 0.5  $\mu$ L LA Taq polymerase を加え、94°C, 1 分間; 60°C, 30 秒; 72°C, 1 分間のサーマルサイクルを 25 回繰り返して増幅した。得られた断片を *EcoRI* 及び *XbaI* で消化後、pCS2+AdN-FTn.gm3 (東京大学、平良真規博士より供与) 内の FLAG tag 領域下流に in frame で組み込んだ (*EcoRI-XbaI* 部位)。

別の一連の分子内欠失 *gbx2* 遺伝子 (*gbx2- $\Delta$ Eh1*, *- $\Delta$ IVR*, *- $\Delta$ Pro*, *- $\Delta$ IP*, *- $\Delta$ EI*, *- $\Delta$ NCR*, *- $\Delta$ Nt*, *- $\Delta$ Lin1*, *- $\Delta$ Lin2*; Fig. 13) の発現コンストラクト作製にあたっては、前述の *ft-gbx2* コンストラクトを鋳型にして、Table 3 で示す逆向き primer 対を用いて Inverse PCR 反応を行い (94°C, 1 分間; Tm, 30 秒; 72°C, 6 分間; 30 cycles)、得られた DNA を *BamHI* もしくは *PstI* で消化後、セルフライゲーションにより環状化した。Eh1 様配列及び高 Pro 配列を両方欠失する *gbx2- $\Delta$ EP* に関しては、*gbx2- $\Delta$ NCR* DNA の *BamHI* 部位に PCR [Gx2dEh1-s(Bam), Gx2dPro-as(Bam); Table 4] で増幅した IVR 配列 (+31 - +55 aa) DNA 断片を組み込むことで作製した。N-terminal core region (NCR) 内各配列と CTR を同時に欠失させたシリーズ (*gbx2- $\Delta$ EC*, *- $\Delta$ IC*, *- $\Delta$ PC*; Fig. 13) については、*gbx2- $\Delta$ C* を鋳型にして、Table 3 で示す primer 対を用いて GXL polymerase を用いた Inverse PCR 反応を行なった (98°C, 10 秒; 68°C, 6 分間; 30 cycles)。得られた DNA を *BamHI* で消化後、セルフライゲーションにより環状化した。

### RNA 合成用の鋳型 DNA の調製

Digoxigenin (DIG) 標識リボプローブの合成及び mRNA の合成の際は、まず鋳型に用いるプラスミド DNA を適切な制限酵素で直線化した。この反応液に sodium dodecyl sulfate (SDS, 最終濃度 1%), Proteinase K (最終濃度 500 ng/ $\mu$ L, SIGMA) を加えた上、37°C で 1 時間保温した。これに等量の phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1; P/C/I) を加えて激しく攪拌し、室温, 15,000 rpm で 1 分間遠心した。得られた上清を新しいマイクロチューブに移した上、1/10 量の 3 M sodium acetate, pH 7.0 と 2 倍量の 99.5% ethanol を加え、4°C, 16,000 rpm で 15 分間遠心した。得られた沈殿を 70% ethanol で洗浄した上、diethyl pyrocarbonate (DEPC, Nacalai Tesque) で処理した純水 (DEPC-DW) に溶解した。

### mRNA 合成

mRNA の合成は、SP6 MEGAscript Kit (Ambion) を用いて以下のように行なった。まず、Proteinase K 処理した直線化プラスミド 1  $\mu$ g に 2  $\mu$ L 10 x reaction buffer, 2  $\mu$ L 10 x ATP, 2  $\mu$ L 10 x CTP, 2  $\mu$ L 10 x UTP, 2  $\mu$ L 2 x GTP, 2  $\mu$ L CAP analog [m<sup>7</sup>G (5') ppp (5') G], 2  $\mu$ L Enzyme Mix 及び DEPC-DW を加えて 20  $\mu$ L とした。これを 37°C で 2-4 時間保温した後、1  $\mu$ L の RNase free DNaseI を加え、さらに 37°C で 15 分間保温した。その後、30  $\mu$ L Nuclease-free Water, 30  $\mu$ L LiCl precipitation soln. を加えて -20°C で 30 分以上冷却し、4°C, 15,000 rpm で 20 分間遠心して沈殿を得

た。これを 70% ethanol で洗浄し、20  $\mu$ L Nuclease-free Water に溶かした。1% Agarose/TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) での電気泳動、吸光度の計測から濃度を算出し、3 本のマイクロチューブに分注して-80°C で保存した。

なお、*gbx2* mRNA 合成の際は、pCS2+/*gbx2* $\Delta$ UTR (Kikuta et al., 2003) を、transposase mRNA 合成には pCS-TP (国立遺伝学研究所、川上浩一博士より供与) を *NotI* で直線化したものを鋳型とした。

### Microinjection

Microinjection 用の針として、ガラス管 (G-1, 1x90 mm, NARISHIGE) をマイクロピペット製作器 (PG-7, NARISHIGE) でキャピラリーとし、実体顕微鏡下で先端を剃刀で切断して用いた。この針の後端から phenol red 溶液 (最終濃度 0.1%, Gibco BRL) と混合した DNA 又は mRNA 溶液を充填し、DNA 液については 1 細胞期の割球、mRNA 液については 1-8 細胞期の割球または卵黄に 1 nL/胚ずつ注入した。

### Whole mount *in situ* hybridization (WMISH) 法

遺伝子の胚内での発現を調べるために、基本的には Schulte-Merker らに従って WMISH を行なった (Schulte-Merker et al., 1992)。

#### (1) プローブの DIG 標識

プローブ作製に用いた遺伝子 cDNA クローンを Table 1 に示した。プローブの標識は、RNA transcription kit (STRATAGENE) と Digoxigenin RNA labeling mix (Roche) を用いて以下のように行なった。直線化と Proteinase K 処理を行なった鋳型プラスミド DNA 1  $\mu$ g に、4  $\mu$ L 5 x transcription buffer (STRATAGENE) または 2  $\mu$ L 10 x transcription buffer (Roche), 2  $\mu$ L 10 x DIG RNA labeling mix, 1  $\mu$ L RNase inhibitor (40 units/ $\mu$ L, ToYoBo), 1  $\mu$ L RNA polymerase を加えて混合し、DEPC-DW で総量を 20  $\mu$ L とした後、37°C で 2-3 時間保温した。1  $\mu$ L RNase-free DNaseI を加えて 37°C で保温した後、2  $\mu$ L 0.5 M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), pH 8.0, 2.5  $\mu$ L 4 M LiCl, 75  $\mu$ L 99.5% ethanol を加え、4°C, 16,000 rpm で 25 分間遠心し、得られた沈殿は 70% ethanol で洗浄した。なお、用いた RNA polymerase は、T3 RNA polymerase (50 U/ $\mu$ L, STRATAGENE)、T7 RNA polymerase (50 U/ $\mu$ L, STRATAGENE)、または SP6 RNA polymerase (20 U/ $\mu$ L, Roche) である。

#### (2) 胚の固定

ゼブラフィッシュ胚を 4°C において 4% paraformaldehyde/137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (phosphate-buffered saline; PBS) 中で 4°C において一晩固定し、卵殻をピンセットで除去した。その後 100% methanol に置換し、使用時まで-20°C で保存した。

### (3) 胚の Proteinase K 処理と後固定

100% methanol 中に保存した固定胚を室温に戻し、以下の全ての操作を室温で行なった。まず固定胚を 50% methanol/PBST (0.1% Tween-20 in PBS) に 5 分間浸し、その後 PBST で 5 分間ずつ 2 度洗浄した。胚が prim-5 ステージ以降の場合、さらに 10 µg/mL Proteinase K/PBST で 5 分間処理した (早い段階の胚では Proteinase K 消化は行っていない)。この後、PBST で 1 分間洗浄し、再度 4% paraformaldehyde/PBS で 20 分間固定した上、PBST で 5 分間ずつ 2 度洗浄した。

### (4) ハイブリダイゼーション

引き続き、固定胚に 300 µL hybridization buffer [50% formamide, 5 x SSC (SSC; 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 0.1% Tween-20, 5 mg/mL yeast RNA, 50 µg/mL heparin] を加え、65°C で 1 時間保温した (プレハイブリダイゼーション)。その後、プローブ (0.1-5.0 ng/µL) を含む 100-1000 µL hybridization buffer に置換し、65°C で一晩保温した。なお、プローブは hybridization buffer 中であらかじめ 68°C, 15 分間加熱した。翌日、hybridization buffer を除去し、50% formamide/2 x SSCT (0.1% Tween-20 in 2 x SSC) 中で 20 分間ずつ 2 回、2 x SSCT 中で 15 分間、0.2 x SSCT 中で 25 分間ずつ 2 回洗浄した。これらの操作はすべて 65°C で行った。

### (5) 抗体処理及び発色反応

0.2 x SSCT を除去し、固定胚に blocking solution [1% blocking reagent, Roche, in MABT (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5)] を加え、室温で 1 時間静置した。その後、AP-抗 DIG 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP-Fab fragments, Roche) を blocking solution で 5000-10000 倍に希釈して加え (用時調製)、4°C で一晩反応させた。翌日抗体液を除いた上、固定胚を室温にて MABT で 15 分間ずつ 6 度洗浄した。

発色反応は NBT-BCIP 発色キット (Nacalai Tesque) を用いて以下のように行った。staining buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20) により、胚を室温にて 5 分間ずつ 2 度洗浄した後、500 µL 発色液に移し、遮光条件下、4°C、室温又は 37°C で 10 分-3 時間発色反応させた。十分発色させた上、胚を PBST で 2 回洗浄し、500 µL 0.1 M glycine-HCl, pH 2.2 もしくは 4% paraformaldehyde/PBS 中で 20 分間以上処理して発色を停止した。処理胚を 30% glycerol、50% glycerol、80% glycerol に段階的に置換して胚を透明化し、顕微鏡観察及び写真撮影を行なった。胚は 80% glycerol 中で 4°C にて保存した。

### *in vitro* におけるタンパク質合成

cDNA を鋳型とした *in vitro* でのタンパク質合成を TnT SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System (Promega) を用いて以下のように行い、Electrophoretic mobility shift analysis に用いた。まず、2 µg の pTnT-gbx2 または

pTnT-foxxg1 に、15  $\mu$ L TnT SP6 High-Yield Wheat Germ Master Mix を加え、MQ 水を用いて全量を 25  $\mu$ L とした。これを 25°C で 2 時間保温して反応させ、得られたタンパク質溶液は-80°C において保存した。用いる際は、4°C, 16,000 rpm で 30 分間遠心し上清を使用した。

### Electrophoretic mobility shift analysis (EMSA)

EMSA は Dig Gel Shift Kit, 2<sup>nd</sup> Genelation (Roche) を用いて以下のように行った。

#### (1) DIG 標識プローブの作製

あらかじめアニーリングを行った 2 本鎖オリゴヌクレオチド (Lmo3-ab-s, Lmo3-ab-as; Table 2) の 3'末端を以下のように DIG で標識し、プローブとして用いた。

まず、15 pmol の DNA に 2  $\mu$ L 5x Labeling buffer, 2  $\mu$ L CoCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ L DIG-ddUTP, 0.5  $\mu$ L TdT を加え、MQ 水を用いて全量を 10  $\mu$ L とした。37°C で 60 分間処理し、エタノール沈殿及び 70% ethanol での洗浄を行った後、10  $\mu$ L TE (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) に溶解した。

#### (2) DNA-タンパク質結合反応

*in vitro* 合成タンパク質 1  $\mu$ L に対して 2  $\mu$ L 5 x binding buffer [100 mM HEPES, pH7.6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM DTT, 1% Tween20, 150 mM KCl], 0.5  $\mu$ L poly[d(I-C)] と必要な場合はコンペティターDNA をモル比でプローブ量の 50-300 倍加え、MQ 水で全量を 9  $\mu$ L として室温で 5 分間静置した。その後、50 fmol/ $\mu$ L の DIG 標識プローブを 1  $\mu$ L 加え、室温で 15 分間静置した。反応後は速やかに氷上に移した。

#### (3) 電気泳動とブロットニング

反応液 10  $\mu$ L に 10 x Loading Dye 2  $\mu$ L を加えて軽く混合し、10  $\mu$ L を 5% polyacrylamide/0.5 x TBE 中で 4°C, 100 V において約 1 時間電気泳動した。あらかじめメンブレン (Amersham Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) と 3 MM ろ紙を 0.5 x TBE に 10 分程度浸しておき、泳動後、polyacrylamide ゲルとメンブレンを密着させ、200 mA で 1 時間エレクトロブロットニングを行った。その後、メンブレンを 2 x SSC で洗浄し、トランスイルミネーターを用いてブロット面に 3 分間紫外線を照射した。

#### (4) 抗体反応と化学発光の検出

メンブレンを Washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% Tween20) で 5 分間洗浄した後、Blocking solution [1% Blocking reagent (Roche) in MAB] で 30 分間処理した。一方、あらかじめ AP-抗 DIG 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP-Fab fragments, Roche) を 4°C で 20 分間遠心し、上清を 1  $\mu$ L 取り 20 mL の Blocking solution に加え、氷上で 5 分以上静置した。メンブレンをこの抗体液で 30

分間処理した後、Washing buffer で 15 分間ずつ 2 回洗浄し、さらに Detection buffer (0.1 M Tris, pH 9.5, 0.1 M NaCl) で 5 分間処理した。メンブレンをハイブリバッグに移し、1 mL の CDP star working solution [1% CDP star (Roche) in Detection buffer] で室温にて 5 分間、37°C にて 10 分間処理した後、これをハイブリバッグから除去し、化学発光を Chemi-Doc XRS (BioRad) を用いて検出した。

### ルシフェラーゼコンストラクトの作製

Gbx2 の転写調節能を検討するため、後脳前端で発現し、MHB 形成に関わる *fgf8a* の MHB エンハンサーである S4.2 領域を、以下のように luciferase 遺伝子につないだ (川村哲規博士が作製)。まず、S4.2-EGFP プラスミド内 (Inoue et al., 2008) の S4.2 領域をプライマー対 (S42-MluI-s, S42-XhoI-as; Table 6) と GXL polymerase を用いて PCR で増幅した (95°C, 30 sec; 51°C, 30 sec; 68°C, 2 min; 30 cycles)。得られた断片は MluI と XhoI で消化した。一方、pGL2-Tbx-Luc (川村哲規博士より供与) を MluI と XhoI で消化し、1% agarose/TAE を用いた電気泳動により、Tbx 結合配列を除去した上、ベクター領域のみをゲルから抽出した。これを CIAP 処理した後、Interferon-β basal promoter 下流に S4.2 DNA 断片を組み込んだ (pS4.2-Luc, Fig. 9A)。

一方 *fgf8a* のプロモーター (zf85'UTR; Inoue et al., 2008) を利用した S4.2-luciferase コンストラクト (pS4.2-Luc2; Fig. 10A) を作製する際には、pS4.2(+)-SZE2 プラスミド (Inoue et al., 2008) 内にある S4.2-zf8p5'UTR 領域を SacI と XhoI で切り出し、pGL4.10(Luc2) (Promega) の Luciferase 遺伝子上流に組み込んだ (SacI-XhoI 部位)。 *fgf8a* のプロモーターのみを持つ luciferase コンストラクト (pf8pro-Luc2; Fig. 10A) を作製する際には、pS4.2-Luc2 の S4.2 領域を SacI と EcoRI で切り出した後、T4 DNA polymerase (TaKaRa) で末端を平滑化し、セルフライゲーションにより環状化した (小林加奈学士が作製)。

### ルシフェラーゼアッセイ

細胞を trypsin 処理により底面からはがし、D-MEM with FBS に懸濁した上、血球計算板により細胞数を計数した。細胞懸濁液の濃度を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL になるように調整し、Tissue Culture Test Plates 24 (TPP) の各ウェルに 500 μL ずつ ( $5 \times 10^4$  cells/well) まき、約 24 時間培養した。

TE に溶解した Luciferasase レポーターコンストラクト DNA を 350 ng、Renilla luciferase コンストラクト DNA (pGL4.75, Promega) を 0.7 ng、エフェクター遺伝子 DNA [pCS2+をバックボーンとしており、CMV (cytomegalovirus) プロモーターで発現がドライブされる] を合計 175 ng 混合した。このとき、total DNA 量を揃えるためには pCS2+を、溶液量を揃えるためには TE を加え、DNA 総量 1 μg あたり、無血清 D-MEM を 100 μL、1 mg/ml Polyethyleneimine, pH7.2 (PEI, linear, MW 25,000, Polyscience Inc.) を 4 μL 加えて混合し、室温で 15 分間静置した。この混合液を 3.5 等分して 3 ウェルに加え、約 24 時間培養した。

Luciferase アッセイは Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて以下のように行った。アスピレーターを用いてウェルから培地を吸引除去し、これに 5 x Passive lysis buffer の 5 倍希釈液を加え (100  $\mu$ L/well)、室温で 15 分間シェイカーにより振とうして細胞を溶解した。Luciferase Assay Substrate と Luciferase Assay Buffer II を混合して調製した Luciferase Assay Reagent II 100  $\mu$ L をマイクロチューブに入れ、これに細胞溶解液 20  $\mu$ L を加え、Luminometer TD-20/20 (TURNER DESIGNS) または GloMax-Multi+ (Promega) でホタル luciferase (FF-Luc) による化学発光を 10 秒間計測した。さらに Stop & Glo Buffer 100  $\mu$ L を加え、*Renilla* luciferase (RL-Luc) による化学発光を同様に計測した。計測値についてはサンプル毎に RL-Luc 活性に対する FF-Luc 活性の値と比 (FF-Luc/RL-Luc) をとり、1 つの実験群あたり 3 点について平均値と標準偏差を求めた。

各エフェクター遺伝子の効果については、レポーター遺伝子 DNA のみを導入した場合 (コントロール) の値を 1 とした相対値で示した。

### ウェスタンブロット解析

細胞を trypsin 液処理により底面からはがし、D-MEM with 15% FBS にて 10 倍希釈した後、60 mm/Collagen-Coated Dish (IWAKI) に 4 mL ずつまいた。翌日、2  $\mu$ g の Plasmid DNA, 4  $\mu$ l 1 mg/ml PEI, pH 7.2 に対し、無血清 D-MEM で全量を 200  $\mu$ L としてよく混合した後、室温で 15 分静置し、全量を培地に滴下して培養した。24 時間後、培地をアスピレーターで除去し、1 x Sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol) を加えて速やかにスクレイパーで細胞を掻き集め、マイクロチューブに回収した。これを Bioruptor (コスモバイオ) により 20 秒 On-20 秒 Off の周期で冷却しつつ 2 サイクル超音波処理した後、95°C で 3 分間熱処理した。

サンプルは、10-20%グラジエント SDS-Polyacrylamide gel (SuperSep Ace, 10-20%; Wako) により電気泳動した (10 mA, 150 分間)。アクリルアミドゲル中のタンパク質は、セミドライトランスファー装置 (BIO CRAFT) により、transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.01% SDS, 15% methanol) 中で PVDF 膜 (Immobilon-P Transfer Membrane, MILLIPORE) 上にトランスファーした (14 V, 120 分間)。トランスファー後、メンブレンを blocking solution [5% Skim Milk (Defco) in TBS-T (20mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)] に室温で 1 時間浸した。次に、Blocking solution で 4000 倍に希釈した peroxidase 結合抗 FLAG モノクローナル抗体 (ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody-Peroxidase Conjugate, SIGMA) と 4°C で一晩反応させた。TBS-T で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、ルミノール発光液 (Immobilon Western chemiluminescent HRP Substrate, MILLIPORE) 中に室温で 5 分間浸し、発光処理を行った。化学発光は、Chemi-Doc XRS (BioRad) を用いて検出した。



### 熱誘導型 *gbx2* 遺伝子 (*hsp-gbx2*) の作製

pzfHSP70/4-EGFP-pA (熊本大学、佐々木洋博士より供与) プラスミド内の *hsp70l* 熱感受性プロモーター配列 (Heat shock promoter; Hsp, 2267-3802 bp) をプライマー対 *hsp-5Xh/hsp-3Hin* (Table 6) を用いて LA-PCR で増幅した (94°C, 1 分間; 62°C, 30 秒; 72°C, 1.5 分間; 30 cycles)。1% agarose/TAE による電気泳動では鋳型 DNA と PCR 断片の泳動度がほぼ同じであるため、*DpnI* で鋳型 DNA を断片化して排除した上で PCR 産物を分離した。得られた断片を DynaExpress TA PCR Cloning Sample Kit (BioDynamics Laboratory Inc.) を用いて pTAC-1 に組み込んだ後、*XhoI* と *HindIII* で Hsp 配列を切り出した。一方、pFT-Gbx2 コンストラクトから *SalI/HindIII* 消化で CMV プロモーターを除去した上で上述の Hsp 断片を組み込んだ (pCS2+hsp-gbx2)。

### 導入胚での *hsp-gbx2* 誘導実験に用いる遺伝子 DNA の調製

*hsp-gbx2* を導入胚で誘導する際は、pCS2+hsp-gbx2 中の Hsp 配列の上流から Poly A 付加部位下流までの DNA 領域を以下のように PCR 法で増幅し、胚に microinjection した。まず 1 µL 1 ng/µL 鋳型 DNA, 10 µL 5 x buffer, 4 µL 2.5 mM each dNTP mix, 各 1 µL 10 µM primer (TnT-3, T3 Primer; Table 6), 1 µL PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を混合して滅菌水で 50 µL とし、98°C, 10 秒; 55°C, 15 秒; 68°C, 3 分間のサーマルサイクルを 30 回繰り返して増幅した。得られた PCR 産物は AxyPrep PCR Clean-up Kit (AXYGEN) で精製し、1% Agarose/TAE による電気泳動で分離後、DNA 量を ethidium bromide 染色により決定し、injection を行う直前に 20 ng/µL になるよう滅菌水で希釈した。

### *hsp-gbx2* Tg 系統魚の作製

Tg 系統を作製する際には、Tol2 トランスポゾンシステムを利用した。まず、pT2AL200R150G (国立遺伝研、川上浩一博士より供与) に、以下のように Multicloning site (MCS) 配列の導入を行った。各 20 µL 30 µM MCS 配列オリゴヌクレオチド相補鎖対 (TOL2-MCS-s, Tol2-MCS-as2; Table 6), 40 µL STE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0) を混合し、80°C で 5 分間加熱した後、50°C まで自然冷却、37°C で 10 分間、室温で 15 分間、氷上で 15 分間静置し、アニーリングを行った。5% polyacrylamide/TBE 電気泳動でのバンドパターンによりアニーリングを確認した。一方、pT2AL200R150G を *XhoI* と *BglII* で消化して Tol2 アーム (Tol2-L と Tol2-R) に挟まれた *egfp* 配列を切り出し、1% agarose/TAE を用いた電気泳動によりベクター領域を分離した上、ゲルから抽出した。このベクター DNA に上記の DNA 断片を組み込んだ (pTol2+MCS)。

次に、pCS2+hsp-gbx2 を鋳型とし、Hsp 制御下にあり、3'に polyA 付加配列を持つ *gbx2* cDNA 領域 (*hsp-gbx2*) をプライマー対 [pCS2toTol2-s(RV), pCS2toTols-as(RV); Table 6] と GXL polymerase を用いて PCR で増幅した (98°C, 10 sec; 60°C, 15 sec; 68°C, 3 min; 30 cycles)。これを *SalI* で消化し、pTol2+MCS 内の 2 つのアー

ムの間の *SalI* 部位に挿入した (pTol2-hsp-gbx2)。

ゼブラフィッシュに *hsp-gbx2* 配列を導入する際は、20 ng/μL pTol2-hsp-gbx2 DNA, 25 ng/μL transposase mRNA 混合液を 1 細胞期の胚に微小注入し (1 nL/胚)、これを 25°C で 40 day post-fertilization (dpf) まで飼育し、循環型水槽に移してさらに飼育した。なお、循環水量は最小限にし、水温が低く保たれるようにした。

### 転移の確認 (Transient Embryonic Excision Assay; TEEA)

Tol2 コンストラクトを transposase mRNA と共導入した胚を 6-8 時間培養した後、0.2 mL チューブに 1 個体ずつ取り、飼育水を除去した。これに ProK soln (100 ng/mL Proteinase K, 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.0) を 20 μL ずつ加え、50°C で 2 時間から一晩加温した。その後、95°C で 5 分間加熱し、Proteinase K を失活させた。1 μL 胚抽出液, 4 μL 5 x Go-Taq buffer (Promega), 2 μL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 μL 2.5 mM each dNTP mix, 0.1 μL 100 μM TEEA 用プライマー対 (T2exR, T2exL; Table 6), 0.1 μL Taq DNA polymerase を混合し、滅菌水を用いて全量を 20 μL とした。これを 95°C で 2 分間加熱した後、94°C, 30 秒; 57°C, 30 秒; 72°C, 2 分間のサーマルサイクルを 35 回繰り返して増幅した。産物は 1% agarose/TAE を用いて電気泳動し、バンドパターンより転移を確認した。

### *hsp-gbx2* 遺伝子の加温誘導

*hsp-gbx2* DNA を微小注入した胚、または *hsp-gbx2* をゲノムに導入した Tg 胚を 25°C で sphere 期まで培養し、それ以降は適切な発生段階まで 23°C または 25°C で培養した。加温誘導をかける際は、あらかじめ胚 (30-100 個程度) はプラスチック製フタ付き深底容器で培養し、処理開始時に飼育水を除去した上、直ちに 37°C に保温した飼育水を注ぎ入れ、さらに 37°C で培養した。処理時間経過後、飼育水を速やかに 23°C または 25°C の飼育水に置換し、適切な段階まで培養した。

### 遺伝子型の判定 (Genotyping)

*hsp-gbx2* Tg 胚を同定するためには、0.2 mL チューブに胚 (生体胚または固定胚) を 1 個ずつ取り、TEEA と同様 Proteinase K 処理を行った上、14,500 rpm で 2 分間遠心し、上清を鋳型 DNA として、*hsp* promoter 内から FLAG tag 内までを増幅するようなプライマー対 [*hsp-down.3*, *Gx2dN-as(Pst-2)*; Table 6] を用いて PCR を行った (98°C, 30 秒; 56°C, 30 秒; 72°C, 1 分間; 40 cycles)。コントロールとして、ゲノム DNA の一部 (第 3 染色体) が増幅するプライマー対 (*fe37b04-F*, *fe37b04-R*; Table 6) を用いて同様に PCR を行った。増幅産物は 2% agarose/0.5 x TBE を用いたゲル電気泳動により確認した。

### 定量的 PCR (Q-PCR)

Transgenic (Tg) 胚あるいは mRNA 注入胚から調製した cDNA 液を MQ 水で 10 倍希釈し、この希釈液 1 μL に各遺伝子に特異的なプライマー対 (各 10 μM; Table 5),

5  $\mu$ L Master Mix (Thunderbird SYBR qPCR Mix, ToYoBo), DEPC-DW を加えて 10  $\mu$ L とした。得られた混合液を 96-Well Reaction Plate (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) の各ウェルに加え (10  $\mu$ L/ウェル)、この液をウェルの中でスピンドウンにより混合し、95°C で 10 分間加熱した後、PCR を行った (95°C, 15 秒; 64°C, 30 秒; 40 cycles)。サイクルごとに SYBR の蛍光を測定し、さらに 1 サイクル反応させた後 (95°C, 15 秒; 64°C, 30 秒)、徐々に 95°C に加熱し、0.3°C ごとに SYBR の蛍光を測定することで PCR 産物の溶解曲線を得た。以上の反応において、各サンプルは triplicate で測定した。

測定の結果は StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) を用いて解析した。Triplicate の中でデータが 1 つだけ振れている場合は排除し、Prism 5 (GraphPad software, Inc.) に導入してグラフを作成した。なお、遺伝子ごとに、野生型胚での発現レベルを基準として *hsp-gbx2* 誘導後の遺伝子発現の相対値を示した。mRNA 導入胚については、*egfp* mRNA 導入胚での発現レベルを基準とした。また、測定値に統計的有意差があるかについては T 検定 (unpaired t-test) を行った。

### マイクロアレイ解析

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型魚とを交配し、得られた胚を Bud 期まで 25°C で培養し、35°C, 15 分間または 37°C, 30 分間の加温処理を行った。終了直後または 2 時間後に 1 個体ずつマイクロチューブに回収し、50  $\mu$ L ISOGEN (ニッポンジーン) を加え、30 秒間ボルテックスミキサーにより激しく混合して胚を破壊した。室温で 5 分間静置後、10  $\mu$ L chloroform/isoamylalcohol (49:1, CIA) を加えて再び 30 秒間激しく混合し、さらに室温で 2 分間静置した。4°C, 15,000 rpm で 15 分間遠心した後、上層を新しいマイクロチューブに移し、-80°C で保管した (RNA 抽出用)。

上層を除去後、残った中間層及び下層に 15  $\mu$ L 99.5% ethanol を加えて混合し、室温で 2 分静置した後、4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心した。上層除去後、0.1 M sodium citrate/10% ethanol を 1 mL 加え、室温で 30 分間緩やかに混和し、4°C で 10 分間遠心した。上清を除去し、もう一度同様に 0.1 M sodium citrate/10% ethanol を加え、混和後、遠心した。上清を除去し、70% ethanol を 1.5 mL 加えて室温で 30 分間緩やかに混和し、4°C で 10 分間遠心した。上清を除去した後ペレットを風乾し、30  $\mu$ L TE に溶解した。

得られた DNA 溶液を鋳型として上記したように genotyping し、得られた結果より、保存しておいた RNA 液を *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> 胚、*hsp-gbx2*<sup>-/-</sup> 胚各群について 1 本のチューブにまとめた (各群で胚数を統一した)。1 胚由来 RNA あたり 25  $\mu$ L の isopropanol を加え、室温で 5 分間静置後、4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心した。得られた沈殿を 70% ethanol でリンス後、風乾し、20  $\mu$ L MQ 水に溶解した。得られた RNA については、1% agarose/TAE を用いた電気泳動及び吸光度計測により品質及び濃度を確認した。

*hsp-gbx2*<sup>-/-</sup> 胚を基準とした *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> 胚での遺伝子発現の変動については、クラボウ (大阪) に GeneChip Zebrafish Genome Array (Affimetrix) を用いた Microarray

解析を依頼した。逆転写、ラベリング及びアレイとのハイブリダイズで得られた発現変動データを受け取り、DNA Microarray Viewer (クラボウ) を用いて解析を行った。

## 結果

### 野生型 *gbx2* の強制発現効果の比較

*gbx2* 遺伝子は、ゼブラフィッシュ胚では後脳前端部で原腸形成後期より発現し、前脳、中脳領域で発現する *otx2* との相互作用により MHB の形成とその維持に働くと考えられる (Kikuta et al., 2003)。mRNA 注入により *gbx2* をゼブラフィッシュ胚で強制発現させると、前脳及び中脳の形成が阻害されることから、*gbx2* はこれら前方脳領域の形成に対して抑制的に働くと考えられる (Kikuta et al., 2003; 金井, 2003)。一方、低レベルでの *gbx2* 強制発現では MHB での峡部形成が主として欠損するとされているが、*gbx2* の強制発現レベルと効果の関係について十分な解析は行われていない。本研究ではまずこの問題に取り組んだ。

*gbx2* mRNA を高レベル (30 pg/胚) で導入すると、26 hpf において、76%の胚で前脳から中脳にかけての領域の形成不全 (前・中脳形成不全) が見られた (n=33; Fig. 1C-C''; Table 7)。これらの胚では終脳、間脳、中脳が消失した一方で、後脳は形成されていた。低レベル (5 pg/胚) で導入した場合は、前・中脳の著しい異常はほとんど見られず、37%の胚で中脳と後脳の境界において峡部形成が特異的に欠損した (n=35; Fig. 1B-B'')。これらの胚でも、終脳、間脳、耳胞は観察された他、中脳相当領域、そして後脳の形成も見られた。以上のように、*gbx2* は高レベルの異所的発現では前脳と中脳全域の形成を抑制すること、峡部が *gbx2* に対して特に感受性が高いことが確認された。

これら *gbx2* 強制発現胚で見られる脳形成異常について、脳領域マーカーの発現を原腸形成終了期において WMISH で詳細に解析した (Fig. 2, Table 8)。高レベルの強制発現胚においては、予定前脳・中脳で発現する *otx2* と予定前脳で発現する *six3b* の発現がいずれも顕著に減少していた (100%, 68%; Fig. 2C, C', F, F', G, G')。また MHB で発現する *pax2a* と *wnt1* についても減少が見られる一方 (68%, 100%; Fig. 2C, C', J, J')、*fgf8a* の発現は 64%の胚で前方へ拡大した (n=28; Fig. 2M, M')。80% epiboly 期における予定後脳での *gbx1* については、発現の減少及び前方へのシフトが観察された (55%, n=20; Fig. 2P, P', R, R')。第 3/5 菱脳節での *egr2b/krox20* の発現は、ほぼ正常であった (96%; Fig. 2C, C')。

低レベルでの強制発現胚においては、*otx2* の発現はやはり低下していたが (97%, n=35; Fig. 2E, E')、そのうち完全に消失した胚は 8.6%であり、発現が維持される胚が多かった (Table 8B)。その一方で前脳での *six3b* はほぼ正常であり (89%, n=18; Fig. 2B, B')、MHB での *pax2a*、*fgf8a*、*wnt1* 発現も正常だった (88.9%, 96.8%, 77.3%; Fig. 2B, B', I, I', L, L')。 *gbx1* については前方へのシフトが見られた (55%; Fig. 2O, O')。後脳における *egr2b* はほぼ正常であった (89%; Fig. 2B, B')。

以上のように、Bud 期において、高レベルでの *gbx2* 強制発現は予定前脳及び中脳の原腸形成期での領域化を阻害するのに対し、後脳領域はほとんど影響を受けないことが示された。低レベルの異所的 *gbx2* 発現条件下では、高レベルの条件と異な

り、*otx2* 発現を除き顕著な発現変動は見られなかった。このことから、初期の脳領域化、特に MHB の確立も含めほぼ正常に起きると考えられる。

26 hpf 胚において同様にマーカーの発現を確認したところ (Fig. 3, Table 9)、高レベル *gbx2* 強制発現胚においては、やはり *six3b* 及び *otx2* の顕著な抑制が観察されたほか (78%, 100%; Fig. 3C, C', F, F')、*wnt1*、*pax2a* も減少していた (42%, 61%; Fig. 3I, I', L, L')。 *fgf8a* の発現は前方にシフトすると同時に (75%; Table 9) 発現レベルが低下した (50%, n=16; Fig. 3O, O')。 *egr2b* は多くの胚で発現が正常だったが、一部の胚では r3 での発現が前方に拡大していた (38%, n=16; Fig. 3R, R')。これらの結果は、Bud 期で見られた結果と対応しており、前・中脳全域の形成が抑制されるとともに、後脳形成が促進された。

一方、低レベル *gbx2* 強制発現胚においてもやはり bud 期と基本的に同様であり、*otx2* 発現は半数の胚で低下した (50%, n=26; Fig. 3E, E')。前脳での *six3b* はほぼ正常であった他、r3/5 の *egr2b* も正常だった (96%, 100%; Fig. 3B, B', Q, Q')。MHB における *wnt1* の発現は、一部で前方へのシフトが見られたが (39%; Table 9)、発現レベルは維持された (100%; Fig. 3H, H')。 *pax2a*、*fgf8a* の発現についても前方へのシフトが見られる他 (52%, 38%; Table 9)、一部の胚で部分的な発現低下が見られたが (19%; Fig. 3N, N')、多くの胚で維持されていた (81%; Table 9)。

このことから、低レベルの *gbx2* の発現条件では、高レベルの条件と異なり、脳の領域化、そして MHB 領域の形成はほぼ正常と言える。

### 活性化型/抑制型 *gbx2* の強制発現効果の比較

*Gbx2* の転写因子としての機能については、HSV タンパク質 VP16 の転写活性化ドメイン、もしくはショウジョウバエ *Engrailed* の転写抑制ドメイン EnR を *Gbx2* ホメオドメインとつないだ *VP16-Gbx2*、*EnR-Gbx2* の各遺伝子について、ゼブラフィッシュ胚への mRNA 導入による強制発現実験が所属研究室での先行研究において為されていた。しかしながら、この研究で用いた *VP16-Gbx2* 遺伝子については、ホメオドメインとともに CTR が含まれており、この領域の影響が考えられること、また、*EnR-Gbx2* 遺伝子については改めて配列を確認したところ、EnR 配列内にアミノ酸置換を伴う塩基置換があり (Gly:Ala)、活性が変化している可能性があった。そこで、いずれについても新たに人工遺伝子を作製した上で、改めて強制発現の効果を検討した (Fig. 4, Table 10)。これらのいずれについても、*Gbx2* のホメオドメインのみを VP16 ドメインあるいは EnR ドメインと融合させており、配列にも問題ないことは確認した (Fig. 4A)。

まず、野生型 *gbx2* mRNA 30 pg を導入し 26 hpf で形態観察すると、すでに観察されたように (Kikuta et al., 2003)、前・中脳の形成不全が見られた (65%, n=72; Fig. 4Bc-c")。同量の *en-gbx2* mRNA を導入したところ、やはり前・中脳の形成が抑制された (65%, n=23; Fig. 4Be-e")。一方、*vp-gbx2* mRNA の導入では、前・中脳形成不全の割合は少なく、むしろ中脳でのみ異常が見られる胚が観察された (51%, n=41; Fig. 4Bg-g")。この結果は 100 pg まで導入量を増やしても同様であり (not

shown)、活性の違いによるものではないと考えられる。

これら強制発現胚において、bud 期で脳領域マーカーの発現を検討した (Fig. 5)。前方神経外胚葉 (予定前脳及び中脳) で発現する *otx2* と前脳マーカーの *six3b* は、野生型 *gbx2* 及び *en-gbx2* の強制発現胚で発現が低下するのに対し (*gbx2*, 63%, 54%; *en-gbx2*, 68%, 75%; Fig. 5B, B', C, C', F, G)、*vp-gbx2* 強制発現胚では発現領域が拡大していた (71%, 41%; Fig. 5D, D', H)。これに対し、後脳 r3/r5 マーカーである *egr2b* の発現領域は、*gbx2* 及び *en-gbx2* 発現胚では大きく拡大するのに対し (*gbx2*, 75%; *en-gbx2*, 60%; Fig. 5N, N', N'', O, O', O''), *vp-gbx2* 発現胚では縮小していた (79%; Fig. 5P, P')。MHB マーカーである *pax2a* は、野生型 *gbx2* mRNA 導入胚において、発現が低下する胚 (36%; Fig. 5J') と発現が前方に拡大 (39%; Fig. 5J''),あるいはシフトする胚 (83%; Fig. 5J) が見られた。*en-gbx2* 胚でも *pax2a* の低下 (70%; Fig. 5K'),あるいは前方へのシフト (88%; Fig. 5K) が観察された。一方、*vp-gbx2* 導入胚ではシフトは見られず、発現低下を示すものが見られた (79%, Fig. 5L, L')。これらのことから、野生型 *gbx2* と *en-gbx2* は似た効果を示し、*gbx2* は転写抑制に働くと示唆された。

これら遺伝子の発現量を定量的に比較するため、上記人工 *gbx2* 遺伝子の強制発現胚を bud 期で回収し、定量的 PCR 法 (Q-PCR 法) を用いて検討した (Fig. 6)。*otx2* 及び *six3b* の発現は、*gbx2*、*en-gbx2* の強制発現胚において、*egfp* 導入胚よりも有意に低下していたのに対し (*gbx2*, 0.1 倍, 0.2 倍; *en-gbx2*, 0.4 倍, 0.1 倍)、*vp-gbx2* の強制発現胚においては増加していた (1.3 倍, 2.4 倍)。また、*egr2b* の発現は *gbx2*、*en-gbx2* の強制発現胚において、*egfp* 導入胚よりも顕著に増加していたのに対し (*gbx2*, 2.8 倍; *en-gbx2*, 1.4 倍)、*vp-gbx2* の強制発現胚においては低下していた (0.4 倍)。*pax2a* の発現量は、*gbx2*、*vp-gbx2* の導入胚において低下し (*gbx2*, 0.4 倍; *vp-gbx2*, 0.6 倍)、*en-gbx2* の導入胚において増加していた (1.4 倍)。これらの結果は、基本的に *in situ* hybridization の結果と一致した。

なお、*en-gbx2* 強制発現胚では、bud 期において前後軸に沿った伸長が見られた (70%, n=20, Fig. 4Bh)。胚の伸長は、多くの場合背側化を伴うとされるため、60% epiboly 期の強制発現胚において、腹側領域に発現する *eve1* 及び背側に発現する *chordin* (*chd*) の発現を観察した (Fig. 7)。野生型 *gbx2* 遺伝子を強制発現させた胚では、*eve1* の発現が低下し、*chd* の発現が拡大していた (82%, 83%; Fig. 7B, B', F, F')。*en-gbx2* 強制発現胚でも同様であったが、*eve1* はより強く減少し、*chd* はより広範囲に拡大していた (86%, 100%; Fig. 7C, C', G, G')。*vp-gbx2* 強制発現胚においては逆に、*eve1* の発現が背側まで拡大し、*chd* の発現が若干低下していた (80%, 29%; Fig. 7D, D', H, H')。これらのことから、*gbx2* には背側化活性があり、*en-gbx2* ではその活性が強まっているのに対し、*vp-gbx2* では弱くなっているといえる。

### Gbx2 の転写調節能の *in vitro* における定量的解析

Gbx2 及び改変 Gbx2 の転写調節活性を定量的に検討するため、培養細胞を用いた luciferase アッセイをおこなった。注目したゼブラフィッシュ *fgf8a* の S4.2 領域

は、所属研究室における *fgf8a* 転写調節領域の研究により見出された配列であるが、内在 *gbx2* が発現する後脳前端での転写活性化能が確認されており、*gbx2* が転写調節に関わっている可能性が高いと予想した。

まず、S4.2 領域の Gbx2 に対する結合能を EMSA により *in vitro* で検討した (Fig. 8)。すでに mouse において Gbx2 との結合が報告されている Lmo3 プロモーター領域内の配列 Lmo-ab (Chatterjee et al., 2012) をプローブとして用い、これに対する未標識 S4.2 内の 3 小領域 (Gx1、Gx2、Gx3; Fig. 8A) の競合活性を検討した。Gx1、Gx2、Gx3 は、それぞれホメオドメイン型転写因子の結合予測配列である "ATTA" を含む 30 bp の配列である。特に Gx3 には、"ATTA" に加えて Gbx2 との結合が報告されている (Inoue et al., 2012) "TAATTA" も含まれる (Fig. 8A)。

まず、*in vitro* で合成したゼブラフィッシュ Gbx2 タンパク質と DIG 標識 Lmo3-ab プローブを反応させると、期待通り 1 本のバンドが出現した (Fig. 8B)。このバンドは、未標識 Lmo3-ab オリゴを 300 倍加えることで消失した。転写因子 Foxg1 の結合配列である BF1 を過剰量加えても消失せず、Foxg1 タンパク質と DIG-Lmo3-ab の結合は見られなかったことから、このバンドは Lmo3-ab と Gbx2 タンパク質との特異的結合によるものと考えられる。次に、Gbx2 タンパク質と DIG-Lmo3-ab の結合反応に Gx1、Gx2、Gx3 の各未標識断片を過剰量加えたところ、Gx3 を加えた場合でのみバンドが消失した。また、Gx3 内の "TAATTA" を "TACGGA" に置換したところ (Gx3mt)、競合活性が失われた。これらのことから、S4.2 は Gbx2 との結合能を持つこと、またその結合は Gx3 内の "TAATTA" 配列が主に担っていることが示された。

次に、S4.2 領域のエンハンサー活性における *gbx2* の役割について、レポーターアッセイを行った。培養細胞株は P19C6 と HEK293T の 2 種類を用いた。P19C6 細胞はマウス胚性腫瘍由来の細胞であり、レチノイン酸処理によって神経系細胞へ分化することが知られる。一方 HEK293T 細胞はヒト胎児腎組織由来の中胚葉性の細胞である。エフェクター遺伝子としては、各種 *gbx2* 遺伝子または MHB 周辺に発現する遺伝子を CMV プロモーターの制御下に置いた発現コンストラクトを用いた。

まず初めに、ヒト *interferon-β* basal プロモーターを用いたレポーターコンストラクト (pS4.2-Luc) を用いた検討を行った (Fig. 9A)。*gbx2* 及び活性化型・抑制型 *gbx2* の転写調節能を調べるため、P19 細胞に S4.2-Luc に加え、野生型 *gbx2*、*en-gbx2*、または *vp-gbx2* をさまざまな量で導入したところ、*gbx2*、*en-gbx2* は導入量に応じて S4.2 活性を抑えたのに対し、*vp-gbx2* は活性を上昇させた (Fig. 9B)。従って、人工遺伝子 *en-gbx2* と *vp-gbx2* は予想通り転写抑制/活性化に働いており、*gbx2* はこの系では転写抑制因子であるといえる。

次に、他の MHB 遺伝子と *gbx2* の転写制御における相互作用を調べるため、S4.2-Luc とともに野生型 *gbx2* と *fgf8a*、*pax2a* を P19 細胞に共導入した (Fig. 9C)。*fgf8a*、*pax2a* を単独で導入すると、各々 S4.2 の活性を抑制 (0.5 倍) または上昇 (1.9 倍) させ、両者を共導入すると協調的に S4.2 活性を上昇させた (4.0 倍)。ここにさらに *gbx2* を共導入すると S4.2 活性は大きく抑制されたことから (0.6 - 0.7



倍)、*gbx2* は単独で S4.2 を抑制するだけでなく、他の因子による S4.2 の転写活性化状態に対しても抑制能があることが示唆された。*en-gbx2* と *vp-gbx2* についても *pax2a/fgf8a* の相乗作用に対する効果を同様に検討した (Fig. 9D)。*en-gbx2*、*vp-gbx2* をそれぞれ単独で導入すると、前述のように S4.2 活性が抑制 (0.6 倍) または上昇 (2.8 倍) したが、*pax2a/fgf8a* による S4.2 活性化能 (8.2 倍) に対して、*en-gbx2* は *gbx2* と同様強い抑制効果を見せた (*gbx2*, 1.1 倍; *en-gbx2*, 2.3 倍)。意外なことに、*vp-gbx2* も *pax2a/fgf8a* による S4.2 活性化を抑えたが、この抑制効果は野生型や *en-gbx2* に比べると弱かった (3.8 倍)。

なお、以上の実験で用いた S4.2-Luc では前述の通り *interferon-β* プロモーターを用いており、内在 *fgf8a* と発現制御が異なる可能性があったため、所属研究室ですでに同定されているゼブラフィッシュ *fgf8a* プロモーター (zf8p5'UTR 領域; Inoue et al., 2006) を用いたコンストラクトを作製し、さらに詳細な解析を行った (pS4.2-Luc2; Fig. 10)。

まず、プロモーター領域の持つ発現制御能を確認するため、プロモーターのみを luciferase 遺伝子上流に組み込んだレポーターコンストラクトを作製し、P19 細胞へ導入した (pf8pro-Luc2; Fig. 10B)。バックボーンベクターである pGL4 と比較すると多少の転写活性は見られたものの (11 倍)、S4.2 領域の存在下でさらに大きく上昇したことから (67 倍)、プロモーター単独でも多少の転写活性化能を持つこと、S4.2 領域が確かにエンハンサーとして機能することが確認された。さらに、プロモーター領域に対する MHB 遺伝子の効果を見るため、*fgf8a*、*pax2a*、または *gbx2* を pf8pro-Luc2 とともに P19 細胞に導入したところ、*fgf8a* はやや転写活性化に働いたが、他の遺伝子については顕著な効果は見られなかった (*fgf8a*, 3.1 倍; *pax2a*, 1.8 倍; *gbx2*, 1.6 倍)。従って、プロモーター領域の転写活性化能は弱いと判断した。

pS4.2-Luc2 レポーターコンストラクトを用いて、P19 細胞における *gbx2* の S4.2 活性への効果を検討した (Fig. 11)。まず *gbx2* をさまざまな量で導入したところ、量依存的に S4.2 の活性を抑制した (Fig. 11A)。また、*en-gbx2*、*vp-gbx2* についてもやはり S4.2 活性を各々抑制、上昇させた (Fig. 11B)。これらの結果は、pS4.2-Luc2 を用いた場合と基本的に一致した。次に *fgf8a*、*pax2a* をそれぞれ単独で導入し、S4.2-Luc2 の発現への効果を検討した (Fig. 11C, D)。*fgf8a* の場合、検討したいずれの導入量においても S4.2 の活性に影響しなかった (Fig. 11C)。*pax2a* については最も低い導入量の 0.096 ng/well で活性の上昇が見られたが (1.6 倍)、量を増やしてもそれ以上増大せず (1.4 - 1.6 倍)、最大量 (300 ng/well) では S4.2 活性はむしろ低下した (0.7 倍)。*fgf8a* と *pax2a* の共導入でも前述のような協調的活性化は見られなかったため (data not shown)、*gbx2* とこれらの遺伝子との共導入実験は行わなかった。

続いて、HEK293T 細胞を用いて pS4.2-Luc2 レポーターの発現に対する *gbx2* とその他の MHB 形成遺伝子の効果を検討した (Fig. 12)。*gbx2* を pS4.2-Luc2 と共導入すると、0.096 - 60 ng/well の範囲において S4.2 の活性は量に応じて低下したが (0.2 - 0.9 倍; Fig. 12A)、P19 細胞の場合と異なり、さらに多量の *gbx2* (300 ng/well)

を共導入したときには逆に S4.2 活性が上昇した (1.2 倍)。次に *en-gbx2*、*vp-gbx2* についても同様の実験を行ったところ (Fig. 12B)、*en-gbx2* の場合、*gbx2* 同様低レベルでは抑制効果が顕著だが、高レベルではその効果が弱くなる傾向があったのに対し、*vp-gbx2* については量に依らず顕著な効果が見られなかった。

*fgf8a* をさまざまな量で pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞に導入すると、導入量依存的に S4.2 活性が低下した (Fig. 12C)。一方、*pax2a* は量依存的に S4.2 の活性を上昇させた (Fig. 12D)。おもしろいことに、P19 細胞の場合と異なり、S4.2 活性に対して *fgf8b* と *pax2a* の協調作用は見られなかった (data not shown)。

さらに、*pax2a* による S4.2 の活性化に対する *gbx2* の効果を検討した (Fig. 12E)。50 ng/well 及び 250 ng/well の *pax2a* を pS4.2-Luc2 と共導入すると、いずれの量でも S4.2 活性が顕著に増大したが (2.4 倍, 2.2 倍)、さらに 50 ng/well の *gbx2* を共導入したところ、S4.2 活性が著しく抑制された (0.2 倍, 0.8 倍)。これらの結果は、pS4.2-Luc 及び P19 細胞を用いた実験のものと同様であり、*gbx2* は *pax2a* によって活性が上昇した S4.2 の転写調節能も強く抑制することが示された。

以上の結果から、S4.2 の転写調節活性は *gbx2* によって負の制御を受けること、*fgf8a* や *pax2a* による S4.2 の活性化もやはり *gbx2* により強く抑制されることが示唆された。

### NTR 又は CTR を欠失させた Gbx2 の強制発現

研究室での先行研究及び上述した本研究での結果より、Gbx2 タンパク質は MHB/ 峡部形成においては主に転写抑制に働く転写因子であることが示された (Kikuta et al., 2003; 金井, 2003)。Gbx2 の活性がタンパク質内のどの領域に依存するかを知るため、菊田により Gbx2 内のさまざまな領域を欠失させた遺伝子の強制発現がゼブラフィッシュ胚に及ぼす効果の検討が行われたが、その際は NTR、CTR のいずれもが前・中脳形成阻害作用を持つことを示唆する結果が得られている。しかし、この実験ではすべての Gbx2 欠失コンストラクトに Myc tag が付加されており、このタグの潜在的効果による可能性があったため (Ferreiro et al., 1998)、今回新たに FLAG tag 付き Gbx2 コンストラクトシリーズを作製した (全長 Gbx2 の N 末に FLAG tag を付加した *ft-gbx2*、NTR 及び CTR を欠失した *gbx2-HD*、NTR を欠失した *gbx2-ΔN*、CTR を欠失した *gbx2-ΔC*、ホメオドメイン及び CTR を欠失した *gbx2-ND*; Fig. 13)。

初めに、FLAG Tag の活性に及ぼす影響を調べるため、*ft-gbx2* と *gbx2* の mRNA をさまざまな量で胚に導入して比較した (Fig. 14)。*gbx2* は前述の実験と同様、30 pg/胚の導入において、70%の胚で前・中脳形成の阻害が見られた (n=272)。しかし導入量を下げて (5 pg/胚) 低レベルで発現させると、前・中脳形成阻害はほとんど見られず、代わって 34%の胚で峡部のくびれ構造が欠損した (n=144)。10 pg/胚、15 pg/胚の場合、ほぼ中間の表現型を示した。次に、*ft-gbx2* mRNA を 30 pg/胚で導入すると、前・中脳形成不全よりも峡部形成不全の胚が多く見られたが (45%, n=56)、これは *gbx2* mRNA 導入胚 (5 pg/胚) の効果と似ていた。導入量を 100 pg/

胚に増やすと、峡部形成不全に代わって前・中脳形成不全の割合が増加し (68%, n=85)、高レベル *gbx2* 強制発現胚と同様の表現型となった。これらのことから、強制発現のもたらす影響は *gbx2* よりも *ft-gbx2* の方が弱くなっているものの、基本的には同様であり、同様の量依存的性が観察された。そこで、以下の実験では全て FLAG tag 付き遺伝子を用いることで異なる分子内欠失の効果の比較を行った。

まず、*ft-gbx2* 及び各欠失遺伝子について mRNA 注入 (50 pg/胚又は 200 pg/胚) により胚で強制発現させ、28 hpf で胚の形態を検討した (Fig. 15, Table 11)。50 pg/胚で注入した場合、すでに先行研究でも記載され (Kikuta et al., 2003)、上述した本研究でも見られた通り、*ft-gbx2* 強制発現胚では前・中脳の欠損した胚が多数見られたが (64%, n=58, Fig. 15E)、峡部特異的な異常はほとんど見られなかった (7%)。これに対し、*gbx2-ΔN* 強制発現胚での前・中脳欠損は 31% (n=26)、*gbx2-ΔC* 強制発現による前・中脳抑制は 29% (n=41, Fig. 15N) であり、*ft-gbx2* に比べて効果は弱いもののやはり前・中脳抑制活性が見られた。峡部特異的な欠損は、*gbx2-ΔN* 強制発現胚では 50% (n=26; Fig. 15K)、*gbx2-ΔC* 強制発現胚では 29% (n=41; Fig. 15N) であり、*ft-gbx2* 強制発現胚よりも増加していた。一方、ホメオドメインのみの強制発現 (*gbx2-HD*) ではほとんど効果が見られなかった (normal 55%, n=31; Fig. 15H)。従って、NTR、CTR のみでも前・中脳抑制能を持つが、ホメオドメイン単独にはその活性はほとんどないといえる。なお、*gbx2-ΔC* からさらにホメオドメインを除去した場合 (*gbx2-ND*)、強制発現させた際の抑制効果は大幅に減弱することから (normal 71%, n=52; Fig. 15Q)、ホメオドメインは Gbx2 の前・中脳抑制機能に不可欠と考えられる。*ft-gbx2* 及び各欠失遺伝子の mRNA を 200 pg/胚で注入した場合、50 pg/胚導入での結果に比べて全体的に死亡胚が増加したが、各遺伝子が持つ前・中脳抑制活性の相対的な強さについて比較すると、ほぼ同様であった。なお、NTR のみ、HD のみの強制発現でも若干の前・中脳または峡部形成不全胚が確認されたが、これらは、内在 *gbx2* に対して拮抗的に働いている可能性が考えられる (data not shown)。

これらの結果は、菊田により観察されたものと基本的には一致しており、以前得られた観察結果は Myc tag の影響を受けてはおらず、実際に NTR、CTR いずれもが前・中脳形成抑制活性をもつことを改めて示唆している。

これらの欠失 *gbx2* 遺伝子強制発現の脳領域化に対する効果を遺伝子レベルで検討するため、脳原基での領域化が開始して間もない bud 期の強制発現胚において (50 pg mRNA/胚)、脳領域マーカーの発現を WMISH 法で検討した (前脳マーカー, *six3b*; MHB マーカー, *pax2a*; 第 3/第 5 菱脳節マーカー, *egr2b*; Table 12)。野生型 *gbx2* (*ft-gbx2*) の強制発現胚では、予想通り、前・中脳マーカーである *six3b* と *pax2a* の発現が顕著に低下した (48%, n=42; Fig. 15D)。*gbx2-ΔN*、*gbx2-ΔC* の強制発現胚でも、割合は低いもののやはり *six3b*、*pax2a* の発現の低下が見られた (*gbx2-ΔN*, 19%, n=26, Fig. 15J; *gbx2-ΔC*, 45%, n=11; Fig. 15M)。なお、一部の *gbx2-ΔN* 強制発現胚及び又は *gbx2-ΔC* 強制発現胚では *six3b* の発現はほぼ正常であり、MHB での *pax2a* の発現のみが低下していた (data not shown)。これに関し、上述したように *gbx2-ΔN* 又は *gbx2-ΔC* 強制発現胚では峡部特異的な欠損が観察されてお

り、これに対応すると考えられる。なお、*gbx2-HD* 強制発現胚及び *gbx2-ND* の強制発現胚については、*six3b*、*pax2a*、*egr2b* の発現は、形態的観察の結果と一致してほぼ正常であった (*gbx2-HD*, normal 97%, n=31, Fig. 15G; *gbx2-ND*, normal 79%, n=14, Fig. 15P)。以上の遺伝子レベルでの検討結果は、基本的に形態的観察の結果と対応している。

### NTR 内の機能配列の検討

欠失実験の結果、NTR 全体が *Gbx2* の前・中脳形成抑制活性の少なくとも一部を担うことが示唆された。NTR 内は各種脊椎動物で保存されていることがすでに指摘されているが (Kikuta et al., 2003; Fig. 16)、この中で +20 aa - +30 aa 領域は Eh1 様配列 (Eh1) の特徴を持っており (Heimbucher et al., 2007)、+56 aa - +64 aa は高 Pro 配列である (Kikuta et al., 2003)。Eh1 はコリプレッサーである Groucho/TLE と結合し、転写において抑制的に働くとされている (Jiménez et al., 1997; Smith and Jaynes, 1996)。また、転写因子で見られる Pro-rich 配列はしばしば RNA polymerase II との親和性を高め、転写活性化の働きを持つとされる (Williamson, 1994)。種間で高度に保存されていることから、両配列が *Gbx2* の機能に重要であることが予想されたため、*gbx2* のこれらの領域に個別に欠失を導入し、mRNA の導入による強制発現実験を行った (Fig. 17)。mRNA 導入はすべて 50 pg/胚で行い、28 hpf で形態観察を行うとともに、bud 期及び 28 hpf の胚で WMISH 法により脳領域マーカーの発現を検討した。

まず、野生型 *gbx2* (*ft-gbx2*) を強制発現させた場合 (50 pg/胚)、bud 期における *six3b* 及び *pax2a* の発現は 56% の胚で減少した (n=126; Fig. 17D)。これに対し、Eh1 を欠失させた *gbx2* (*gbx2-ΔEh1*) を強制発現した場合、*ft-gbx2* と比べて *six3b*、*pax2a* の発現低下率は低く (19%, n=36; Fig. 17G)、*gbx2-ΔN* の効果と類似していた。また、28 hpf において、*ft-gbx2* 強制発現胚では前・中脳形成不全の割合が 50% (n=90; Fig. 15E) だったのに対し、*gbx2-ΔEh1* 強制発現の場合、31% に減少した (n=110; Fig. 17H)。この効果もまた、*gbx2-ΔN* とほぼ同等であった。従って、Eh1 は NTR の前・中脳形成抑制活性を担う主要機能配列と考えられる。

高 Pro 配列欠失 *Gbx2* の強制発現では (*gbx2-ΔPro*)、bud 期において *six3b*、*pax2a* の発現低下率は 51% であり、*ft-gbx2* の場合とほぼ同じだった (n=196; Fig. 17J)。しかし、28 hpf で観察した場合、*gbx2-ΔPro* の前・中脳欠損効果は 30% であり、*ft-gbx2* に比べてやや減弱した (n=168, Fig. 17K)。従って、高 Pro 配列は前・中脳形成抑制に関与するが、Eh1 に比べて部分的、あるいは 10 hpf 以降の体節形成期に機能すると考えられる。なお、bud 期の *gbx2-ΔPro* 発現胚の一部で動植物極軸に沿った伸長が見られ (34%, n=123; Fig. 18Ac)、脳領域マーカーの発現が腹側まで拡大していた (33%, n=123; Fig. 18Ag, g')。いずれも胚の背側化時に見られる表現型であり (Stachel et al., 1993)、これらの結果は *gbx2* に背側化活性が内在しており、高 Pro 配列がこれを阻害している可能性を示唆する。背側化に関連して、前述の *en-gbx2* の強制発現でも背側化胚が見られていたほか、*gbx1* についても、25 pg/胚の量

で注入したとき、47%の胚で胚の伸長が見られ (n=49)、一部ではさらに脳領域マーカーが腹側へ拡大していた (8%, n=49; Fig. 18Ai, i'')。

Eh1 配列と高 Pro 配列を両方欠失させた場合 (*gbx2-ΔEP*)、強制発現胚の bud 期での前・中脳マーカーの発現抑制活性は *gbx2-ΔN* に比べて弱い、意外なことに *gbx2-ΔEh1* より強かった (異常率は 44%, n=9; Fig. 17M)。しかし、28 hpf で形態観察した場合、*gbx2-ΔEh1* と同程度であった (31%, n=129, Fig. 17N)。この結果についてはさらに検討する必要があるが、Eh1 は Gbx2 の N 末領域による前・中脳形成抑制効果の主たる活性領域であり、発生時期によっては高 Pro 配列と相互作用があるかもしれない。

Eh1、高 Pro 配列に挟まれた領域 (Intervening region, IVR; +31 aa to +55 aa) もまた種間で高度に保存されている (Fig. 16)。この IVR 配列を欠失した *gbx2* 遺伝子を作製し (*gbx2-ΔIVR*)、mRNA 導入による強制発現の効果を 28 hpf で観察すると、前・中脳形成が抑制された胚も見られるが (23%, n=172)、これとは別に、前脳は形成される一方で中脳様構造が肥大するとともに峽部を欠損した胚が見られた (12%, n=172; Fig. 17Q)。この中脳・峽部異常胚においては、前脳における *six3b* の発現は正常だが峽部マーカーの *pax2a* の発現が消失していた (100%, n=7; Fig. 17R)。しかし、bud 期の *gbx2-ΔIVR* 発現胚では *six3b*、*egr2b* のみならず、MHB での *pax2a* の発現も正常であった (Fig. 17P)。

Eh1 様配列と IVR 配列を同時に削った欠失遺伝子を強制発現すると (*gbx2-ΔIE*)、*gbx2-ΔEh1* で残存していた前・中脳抑制効果が大きく減少した (Table 16)。また IVR と高 Pro 配列を欠損した *gbx2* (*gbx2-ΔIP*) を強制発現させると、*gbx2-ΔPro* で多く見られた死亡率が減少した。すなわち、IVR 配列と Eh1 様配列及び高 Pro 配列との間には相互作用があると推定される。その一方で、IVR 配列、Eh1 様配列、高 Pro 配列をすべて欠失させた *gbx2* を強制発現させたところ (*gbx2-ΔNCR*)、*gbx2-ΔIVR* 発現胚と同様の中脳・峽部異常がさらに高率で観察された (36%, n=156; Fig. 17T)。このことも、IVR 配列と Eh1、高 Pro 配列の相互作用を示唆する。*gbx2-ΔNCR* の作用についてはさらに詳細な解析を行っており、後述する。

Eh1 様配列、IVR 配列、高 Pro 配列以外に NCR 内に特徴的配列はなく、高 Pro 配列とホメオドメインに挟まれた配列 (Linker 配列) は比較的保存性が低い (Fig. 16)。これらの領域についても欠失遺伝子を作製し、強制発現を行った。すなわち、Eh1 より N 末側の配列 (N-terminal end sequence, Nt; +1 aa to +19 aa) を削った *gbx2-ΔNt*、Linker 配列のうち、N 末側 (Linker 1; +66 aa to +152 aa) が欠失した *gbx2-ΔLin1*、C 末側 (Linker 2; +153 aa to +238 aa) が欠失した *gbx2-ΔLin2* の 3 種を作製し、mRNA 注入による強制発現の効果を検討した (Fig. 19, Table 16)。結果、いずれの遺伝子についても、*ft-gbx2* の強制発現効果とほぼ同様の前・中脳形成不全が見られたことから、これらの領域の欠失は Gbx2 の前・中脳抑制効果には影響を与えないと考えられるため、NTR 内の活性中心は、Eh1 様配列、IVR 配列、高 Pro 配列であるといえる。以後、この領域をまとめて NCR (N-terminal Core Region) と呼ぶ。

## NCR と C 末の同時欠失効果の検討

NTR 内欠失 *Gbx2* 遺伝子を用いた強制発現実験により、前・中脳形成抑制に関する NTR 内の活性中心は NCR であると推定されたが、NCR、あるいはその内部配列を *Gbx2* から欠失させても前・中脳抑制活性は残存した。これら NCR 内欠失遺伝子にも CTR が存在するが、この領域も前・中脳抑制活性を持つことから、NCR 内各配列と CTR を同時に欠失した人工遺伝子を新たに作製し、形態に及ぼす効果を検討した (*Eh1* 様配列と CTR を欠失した *gbx2-ΔEC*、IVR 配列と CTR を欠失した *gbx2-ΔIC*、高 Pro 配列と CTR を欠失した *gbx2-ΔPC*; Table 16)。26 hpf で脳の形態を観察したところ、*gbx2-ΔEC* 強制発現胚では *gbx2-ΔEh1* で見られた前・中脳抑制活性がほぼ消失した (前・中脳形成不全, 0%; 峡部欠損, 2%; n=60)。*gbx2-ΔIC* では *gbx2-ΔIVR* と比べ、前・中脳形成抑制の割合が 6%に減少する一方、峡部欠損の割合がやや増大した (14%, n=35)。つまり、前・中脳抑制能は *gbx2-ΔIVR* より低下したと言える。その一方で、*gbx2-ΔIVR* 胚で見られた中脳・峡部異常の割合が 3%と下がっていた。*gbx2-ΔPC* 強制発現の場合の前・中脳形成不全率 (26%, n=62) は *gbx2-ΔPro* 発現胚 (29%, n=168) でのものと同程度だったが、*gbx2-ΔPro* 胚で顕著であり背側化に由来すると思われる死亡率が大きく低下した (*gbx2-ΔPro*, 24%; *gbx2-ΔPC*, 7%)。従って、死亡も考慮すると、*gbx2-ΔPC* 強制発現胚では異常率が低下している。これらのことから、*gbx2-ΔEh1* と *gbx2-ΔIVR* で残存する前・中脳抑制活性は CTR によるといえる。また *gbx2-ΔPro* 発現胚での背側化効果、*gbx2-ΔIVR* 発現胚での中脳・峡部異常が CTR の除去によって大幅に低下したことから、これらの活性についても CTR が関与することが示唆された。

## *gbx2-ΔNCR* 強制発現の効果と *fgf8a* 変異体の表現型の比較

*gbx2-ΔIVR* 及び *gbx2-ΔNCR* の強制発現胚で見られる峡部欠損・中脳肥大異常は *fgf8a* 変異体 (*acerebellar*, *ace*; Brand et al., 1996) で見られる頭部での表現型とよく似ている。実際、*ace* においては中脳構造が肥大する一方、峡部、そして小脳が消失する (Reifers et al., 1998)。28 hpf の *ace* 胚で *six3b*、*pax2a*、*egr2b* の発現を観察すると、MHB における *pax2a* の発現のみが消失する点も、*gbx2-ΔIVR* 又は *gbx2-ΔNCR* の発現胚と一致する (100%, n=8; Fig. 20A)。これらの類似性から、*gbx2-ΔIVR/ΔNCR* は *fgf8a* の発現抑制を介して *ace* 様の表現型をもたらす可能性が示唆された。

しかし実際は、*gbx2-ΔNCR* 強制発現胚でも bud 期では *fgf8a* の発現は正常であり (95%, n=19; Fig. 21F, F')、*gbx2-ΔNCR* 強制発現効果は *fgf8a* の発現低下では説明できない。なお、28 hpf においては MHB での *fgf8a* の発現は消失していたが (94%, n=33; Fig. 23L, L')、これは MHB・峡部が形成されなかったことによる二次的な影響と考えられる。*ace* では峡部の欠損に加え耳胞の縮小も見られるが、*gbx2-ΔNCR* 強制発現胚ではコントロールと比較して耳胞の大きさに有意差はない (T 検定, 0.86; Fig. 20B, C)。また、*ace* 胚では *otx2* の発現が後方に拡大することが報告され

ているが (Reifers et al., 1998)、後述するように *gbx2-ΔNCR* 強制発現で *otx2* の発現上昇は観察されていない。以上のことから *gbx2-ΔIVR* 又は *gbx2-ΔNCR* による表現型は *ace* のものと区別可能であり、これら欠失 *gbx2* の効果は *fgf8a* 発現の欠損を介したのではないと言える。

### NCR 配列欠損 *gbx2* の強制発現で見られる脳パターンニングの異常についての検討

*gbx2-ΔIVR* 及び *gbx2-ΔNCR* の強制発現胚と同様、*gbx2* の低レベル強制発現胚でも峡部欠損が観察される。しかし、前者では中脳が肥大するように見えるのに対し、後者では中脳肥大は見られない。*gbx2-ΔIVR* 及び *gbx2-ΔNCR* の効果が *gbx2* 活性の低下に依るのか、それとも異なる異常を起こすのかについて、以下に検討した (Fig. 21)。

まず、*gbx2-ΔNCR* mRNA 導入胚 (mRNA 導入量は全て 100 pg/胚) における各種遺伝子を bud 期で検討した。まず、予定前脳での *six3b* の発現は正常であり (Fig. 21B, B')、前方神経外胚葉での *otx2* の発現も低下するものの検出された (Fig. 21D, D')。MHB での *pax2a* と *fgf8a*、そして予定後脳領域での *gbx1* (80% epiboly 期) の発現はほぼ正常であったのに対し (Fig. 21B, B', F, F', J, J')、*wnt1* の発現は著しく低下した (Fig. 21H, H')。後脳菱脳節での *egr2b* の発現は正常であった (Fig. 21B, B')。以上の結果を低レベルでの *gbx2* 強制発現の効果と比べると、*otx2*、*six3b*、*pax2a*、*fgf8a*、*gbx1* についてはほぼ同様であるが、*wnt1* の発現低下については明らかに異なる。

### NCR 配列欠損 *gbx2* の強制発現による脳形成への効果の検討

次に、脳の基本的パターンニングが終了し、神経形成が進行する 28 hpf において、*gbx2-ΔNCR* の効果を高レベル *gbx2* 強制発現のものと比較した (mRNA 導入量はすべて 50 pg/胚)。まず、終脳での *emx3*、間脳での *dlx2a*、前脳及び眼胞での *six3b* の発現を検討すると、高レベル *gbx2* 強制発現胚においては、*emx3* の発現は 50%の胚で消失しており (n=12; Fig. 22C)、*dlx2a* の発現も終脳、間脳領域で消失していた (100%, n=13; Fig. 22F)。*six3b* は上述したように眼胞での発現が消失し、終脳、間脳の前端における発現領域が変形した (78%, n=36; Fig. 22I, I', Fig. 3C, C')。一方、*gbx2-ΔNCR* 発現胚ではこれらの遺伝子の発現はいずれも正常であった (Fig. 22B, E, H, H')。以上のように、*gbx2-ΔNCR* 発現による中脳・峡部形成異常胚において、前脳形成は遺伝子レベルで見ても正常であることが示された。一方で、*otx2* の間脳・中脳での発現は、高レベル *gbx2* 発現胚では全て消失したが、*gbx2-ΔNCR* 導入胚の場合、中脳ではほぼ消失するのに対し、間脳ではほぼ正常に見られた (100%, n=7; Fig. 22K, K')。以上のことから、*gbx2-ΔNCR* 導入胚で前脳は正常に形成されており、異常は中脳及び峡部に限定されていると言える。

次に、MHB/峡部遺伝子に対する *gbx2-ΔNCR* の効果を 28hpf で検討した。*wnt1* の発現は、上述したように、*gbx2* の高レベル強制発現胚ではこの時期低下するが (Fig. 3I, I')、低レベルでは観察される (Fig. 3H, H')。*gbx2-ΔNCR* 発現胚の場合、峡

部での発現は顕著に低下した (Fig. 23B, B')。 *eng2a* についても *gbx2-ΔNCR* 導入胚の MHB 発現低下が見られた (Fig. 23D, D')。 *pax2a* 及び *fgf8a* の発現は、低レベルでの *gbx2* 強制発現の場合 (Fig. 3N, N')、そして *gbx2-ΔNCR* 導入胚の bud 期の場合と異なり、峽部構造では消失していた (Fig. 23G, G', L, L')。 *efna5a* は、28 hpf の中脳視蓋後方及び小脳領域において、峽部をピークとした発現勾配を示すが、その他に眼胞、咽頭弓、脊索前方などでも発現が見られる (Fig. 23H, H'; Thisse et al., 2001)。 *gbx2* 高レベル強制発現胚の脳においては、発現領域が神経管前端にシフトしており (85%, n=13; Fig. 23J, J')、*gbx2* により後方化されたと考えられる。これに対し、*gbx2-ΔNCR* 強制発現胚の場合では、MHB での発現が眼胞の近傍へ移動していた (81%, n=16; Fig. 23I, I')。以上のように、*gbx2-ΔNCR* により 28 hpf で見られた効果は、峽部マーカーの顕著な発現低下という点で *gbx2* の弱い効果とは区別可能であった。

さらに、*gbx2-ΔNCR* の後脳あるいは小脳の形成への効果について 28 hpf 胚で検討を行った。 *elavl3* (*HuC*; Kim et al., 1996) は神経分化マーカーであり、28 hpf 胚では、終脳、中脳被蓋などの前・中脳の一部、眼胞の一部、後脳で発現する一方、中脳背側 (視蓋) では発現せず、MHB 付近で発現のギャップが見られる (Fig. 24A, A'; Kudoh et al., 2001)。高レベル *gbx2* の強制発現胚では前・中脳での発現と MHB でのギャップがなくなっていたが、後脳以降での発現は正常であった (100%, n=15; Fig. 24C, C')。一方、*gbx2-ΔNCR* 強制発現胚の場合、*elavl3* の発現は、終脳・間脳では正常であるが、中脳様構造の背側で拡大する一方で MHB でのギャップがなくなっていた。なお、後脳及び後方は正常であった (93%, n=15; Fig. 24B, B')。 *atoh1a* (*zath1*) も分化神経細胞のマーカーであり、24 hpf では上菱脳唇・小脳 (upper rhombic lips; URL)、下菱脳唇 (lower rhombic lips; LRL)、耳胞で発現が見られる (Fig. 24D, D'; Adolf et al., 2004; Köster and Fraser, 2001)。 *gbx2* を高レベルで強制発現した場合、*atoh1a* の発現は神経管の前端へ拡大した (100%, n=37; Fig. 24F, F')。この結果は、*gbx2* の後方化効果により MHB が前端へシフトしたことによると思われる。一方、*gbx2-ΔNCR* の強制発現胚では *atoh1a* の発現領域は中脳様領域へ拡大し、一部の胚ではさらに前方でスポット状に発現していた (95%, n=19; Fig. 24E, E')。同様の異所的発現は、30 hpf の峽部異常胚でも観察された (data not shown)。 *grhl2b* は近年新たに報告のあった MHB 関連遺伝子で、峽部構造の形成に関与するとされるが (Dworkin et al., 2012)、体節形成期における発現は嗅覚原基、レンズ、耳胞、側線原基など他の発現領域の方が強い (Fig. 24G, G'; Han et al., 2011)。22 体節期において、*gbx2* の高レベル強制発現胚では耳胞での発現が前方へ拡大していたが (47%, n=19; Fig. 24I, I')、これは同じく耳胞で発現する *atoh1a* の発現拡大と一致する (Fig. 24F, F')。一方、*gbx2-ΔNCR* の強制発現胚では、耳胞、後方側線原基での発現は正常であったが、嗅覚原基及び前方側線原基での発現が低下していた (89%, n=19; Fig. 24H, H')。 *egr2b* は前述の通り第 3/5 菱脳節に発現する遺伝子であるが、*gbx2-ΔNCR* 発現胚でのパターンは正常であった (100%, n=13; Fig. 24K, K')。これらのことから、*gbx2-ΔNCR* の強制発現による中脳・峽部異常胚では、体節形成終了



期において、中脳領域の分化異常と小脳領域の前方への拡大が起きる一方、第3 菱脳節以降の後脳は正常であることが示された。

なお、3 日胚で小脳神経細胞マーカーである *pvalb7* の発現を確認すると、*gbx2* の高レベル強制発現胚では小脳での発現が消失していたのに対し (Fig. 24N)、*gbx2-ΔNCR* 強制発現胚では小脳の発現が前後に拡大するとともに中脳様構造で異所的な発現があった (Fig. 24M)。つまり、体節形成期で見られた脳形成の異常は後期の胚になっても観察される。

以上のように、*gbx2-ΔNCR* の強制発現胚では、前脳、菱脳はほぼ正常に発生するのに対し、中脳から小脳にかけて異常が見られており、中脳領域が小脳の性質を新たに獲得すると推定された。また、この欠失遺伝子の効果は、低レベルでの *gbx2* 強制発現効果と一見形態的に似ているが、*bud* 期での *wnt1* に対する抑制効果、その後の峡部でのマーカー発現等により区別可能であり、*NCR* の欠失は、単なる *Gbx2* の活性低下とは異なる効果を持つと考えられる。

### ウェスタンブロットによる発現の確認

これまで見てきた *gbx2* 欠失遺伝子について、翻訳産物が細胞内で発現しているかどうかを確かめるため、各遺伝子発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入した。用いた発現プラスミド内遺伝子はやはり pCS2+内の CMV プロモーターにより発現が活性化される。導入 HEK293T 細胞の抽出液中の各遺伝子産物タンパク質を、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットで検出したところ (Fig. 25)、全てのコンストラクトで同様の強さのバンドが検出された。分子量マーカーと比較した結果、各遺伝子産物の分子量は予想サイズ (*Gbx2*, 38.9 kDa; HD, 12.3 kDa; ΔN, 16.5 kDa; ΔC, 34.7 kDa; ND, 24.6 kDa; ΔNt, 37.1 kDa; ΔNCR, 34.3 kDa; ΔLin1, 30.0 kDa; ΔLin2, 30.2 kDa; ΔEh1, 38.0 kDa; ΔIVR, 36.4 kDa; ΔPro, 38.2 kDa; ΔEI, 35.3 kDa; ΔIP, 35.4 kDa; ΔNCRΔC, 29.7 kDa) よりもやや大きいものもあるが、相対的にはほぼ予想されるサイズであり、各欠失遺伝子は細胞内で同レベルで発現すると判断できる。

### 時期特異的な活性化が可能な誘導性 *gbx2* 遺伝子の作製

これまでに *gbx2* の機能解析のために行われた強制発現実験は、ゼブラフィッシュ、*Xenopus* の場合、受精卵への mRNA 導入に依存しており (Kikuta et al., 2003; King et al., 1998; Tour et al., 2002)、特定発生段階での機能解析はほとんどない。金井はホルモン誘導性 *gbx2* 遺伝子を利用することで、*gbx2* の前・中脳形成抑制効果に対する感受性は原腸形成期に強く、体節形成期になると低下することを示唆したが (金井, 2003)、この実験で体節形成期に *Gbx2* が実際にホルモン処理で活性化されているのかについては確認されていなかった。

本研究では、発生時期ごとに *gbx2* の機能について検討するため、*gbx2* cDNA と熱誘導性タンパク質 (heat shock protein 70I; *hsp70I*) の熱感受性プロモーター領域をつないだ熱誘導型遺伝子を作製し (*hsp-gbx2*; Fig. 26A) このコンストラクト DNA

を導入した胚 (10 pg/胚) に異なる発生時期で加温処理を加えることで (37°C, 30 分間) *gbx2* 遺伝子の活性化を行った (Fig. 26B)。 *hsp-gbx2* 導入胚を通常の培養温度 (28.5°C) で培養すると、ほとんどの胚が sphere 期までに死亡するため (data not shown)、加温処理時以外は 25°C もしくは 23°C で培養した。

まず、導入遺伝子が熱誘導により活性化されるかを確認するため、本来 *gbx2* が発現しない 50% epiboly 期に *hsp-gbx2* 導入胚を 30 分間加温処理した。なお、熱誘導直後、*hsp-gbx2* 導入胚の生存率 (77%; Table 19A) は未導入胚を加温処理した際 (90%, n=30) に比べてやや低いものの、明瞭な形態異常は見られなかった。一部で見られる死亡胚は、胚盤周縁部がくびれ、卵黄が破裂したものが多かった (data not shown)。

生存胚については *gbx2* mRNA の発現を WMISH で染色し、側面から胚を観察した上で、*gbx2* を異所的に発現している胚領域の面積が全体の 50%以上である場合を (++)、50%未満の場合を (+)、全く発現していない場合を (-) と判定した (Fig. 27A, Table 18A)。その結果、加温処理した *hsp-gbx2* 導入胚の場合、固定胚の 83%で *gbx2* の異所的な発現が広範に見られており (++, n=12; Fig. 27Ad, d')、導入遺伝子は加温処理に応答して実際に活性化されることが確認された。なお、加温処理しなかった *hsp-gbx2* 導入胚でも、まばらで弱いながら *gbx2* の異所的な発現が見られており [(+), 72%, n=18; Fig. 27Ac, c']、Hsp プロモーターは、低温で培養した場合でも一部で弱く機能することが示された。

次に、加温処理の最適条件の検討を行った。 *hsp-gbx2* 導入胚を bud 期において 0 – 20 分間加温処理し、直後に固定して *gbx2* の発現を確認すると、加温処理時間が 5 分間だった場合、70%で既に異所的発現が見られた (n=10; Fig. 27Bd, d', Table 20)。処理時間が長くなるにつれて *gbx2* の異所的発現率と発現レベルは上昇し、20 分間処理した胚では 57%で強い発現があった (n=7; Fig. 27Bg, g')。

加温処理胚をさらに培養して prim-5 期に形態的に観察すると、加温処理をしなかった遺伝子導入胚は 68%が正常だったのに対し (n=19; Fig. 27Ca, Table 19B)、20 分間処理では正常胚が 53%に低下し、同時に前・中脳欠損胚が見られた (18%, n=17; Fig. 27Cb)。未導入胚は、加温処理の有無に関わらずほぼ全てが正常に発生した (無処理, 97%, n=30; 20 分間処理, 92%, n=25)。なお、*hsp-gbx2* と共導入した pCS2-EGFP の蛍光を同時期の胚で確認したところ、発現量・発現領域にばらつきはあるが、多くの胚で実際に導入遺伝子の発現が見られた (Fig. 27Cc)。

これらの結果から、*hsp-gbx2* 遺伝子の導入及び胚への加温処理によって *gbx2* の発現誘導が可能であり、強制発現効果は有効であることが示された。

### ***hsp-gbx2* を保有する Tg 魚を用いた時期特異的強制発現**

次に、この遺伝子をゲノム DNA 内に持つ Tg 系統を作製した。 *hsp-gbx2* Tg 魚はヘテロで維持し、実験では野生型魚と交配して得られる子孫胚を用いた。得られた子孫胚において、胚数は  $hsp-gbx2^{+/+} : hsp-gbx2^{-/-} \cong 1 : 1$  となると期待される。まず、F2 世代以降の子孫魚において、shield 期または bud 期で加温処理を行い、直後

に固定して *gbx2* の発現を確認したところ、35°C, 15 分間または 37°C, 30 分間のいずれの加温条件でも、約半分の胚において、全体で強い異所的発現が見られた (Fig. 28A)。発現増加を定量化するため、異なる発生時期 (shield 期、bud 期、18 体節期) に 37°C, 30 分間の条件で Tg 胚及び野生型胚に加温処理した後、直後に Total RNA を抽出し、*gbx2* コード領域と *gbx2* 3'-UTR の発現量を Q-PCR 法で解析した (Fig. 28B)。*gbx2* コード領域の発現は誘導遺伝子、内在遺伝子の発現量、*gbx2* 3'-UTR の発現量は内在 *gbx2* の発現量を示す。*gbx2* 3'-UTR は発現量がほとんど変化しないのに対し、*gbx2* コード領域については、どの発生時期においても野生型胚に比べ Tg 胚で発現量が顕著に増加していた (62 - 149 倍)。従って、内在の *gbx2* の発現は加温処理でも増大せず、増加した *gbx2* コード領域の発現は *hsp-gbx2* 由来であり、この誘導条件で、内在発現に比べて大幅な発現増大が起きると結論した。

また、誘導された *gbx2* mRNA の加温処理後の減衰を検討するため、bud 期で加温誘導 (37°C, 30 分間) 後 0 時間 (hours-post-heat shock; hph)、1 hph、2 hph で固定し、*gbx2* 発現を確認した (Fig. 29A)。内在 *gbx2* は bud 期において、後脳前端で既に発現を開始しているが、0 hph においては、38%の処理胚で正常な *gbx2* 発現のみ見られ、残りの 62%で胚全体に強い異所的な発現が確認された (n=13; Fig. 29Aa, a', b, b')。1 hph においては、53%の胚で異所的な発現が見られたが、0 hph と比較して染色が弱くなっていた (n=15; Fig. 29Ac, c', d, d')。2 hph においては、正常胚と *gbx2* 誘導胚は区別できるものの、染色は非常に弱かった (n=15; Fig. 29Ae, e', f, f')。発現変動を定量化するため、各処理胚から total RNA を抽出し、*gbx2* コード領域と *gbx2* 3'-UTR の発現量を Q-PCR 法で解析したところ (Fig. 29B)、*gbx2* の発現量は、野生型加温処理胚と比較して、0 hph で 102 倍と最も高く、その後 1 hph で 35 倍、2 hph で 16 倍と加温処理後速やかに減退していた。*gbx2* 3'-UTR の発現量はほとんど変化していないことから、*gbx2* コード領域の発現変動は *hsp-gbx2* 由来と考えられる。なお、3 - 4 hph において *gbx2* 3'-UTR の発現量が有意に増大していた。後述するが、このことから、*gbx2* は直接ないし間接的に自身の転写を活性化する可能性が示唆された。これらの結果より、この Tg 系統における *gbx2* 誘導は一過的であると言える。

### 時期特異的な *gbx2* 誘導の脳形成に及ぼす効果

以上のように、*gbx2* の時期特異的な発現誘導実験における Tg:*hsp-gbx2* 魚の有用性が確認された。この魚を用い、異なる発生時期での *gbx2* 機能について検討するため、MHB の決定期とされる bud 期を中心に shield 期から 18 体節期までにおいて加温処理を行った (35°C, 15 分間)。その後、体節形成終了期 (prim-5) で観察すると (Fig. 30)、峡部領域のくびれが欠損した異常胚が見られたが、加温処理の発生段階で異常率が大きく異なっていた。最も効果が強かったのは bud 期での処理で、約半数が異常を示したが、その多くは全く峡部が形成されない個体 (severe defect) であった。Bud 期の前後 (80% epiboly 期、6 体節期) で加温処理をした群では、やはり約半数の個体で峡部に異常が見られたが、多くの場合、部分的にくびれ構造が見られ

た (mild defect)。Shield 期の処理個体では全異常率が低く、18 体節期の処理群ではほぼ全てが正常であった。このことから、*gbx2* の強制発現効果は MHB が決定されるとされる bud 期前後で最も高くなり、その後速やかに減退することが示唆された。

続いて、*gbx2* の誘導による脳領域化への効果を検討した (Fig. 31)。Shield 期から 21 体節期まで 7 つの発生段階において、35°C、15 分間の加温処理をした後、prim-5 期で脳領域マーカーの発現を検討した。前脳での *six3b*、菱脳節での *egr2b*、底板及び zona limitans intrathalamica (ZLI) での *shh* の発現は、どの時期に処理した胚においても正常であった。その一方、峡部における *pax2a* 及び *fgf8a* の発現について低下が見られた。*pax2a* は 80% epiboly 期と bud 期での処理により完全に消失するが (Fig. 31H, L)、10 体節期以降に処理した胚ではほぼ正常であった。*fgf8a* は bud 期処理の胚でのみ完全に消失し (Fig. 31N)、bud 期を除く shield 期から 10 体節期までに処理した胚では部分的に消失が見られ (Fig. 31F, J, R, U)、18 体節期以降で処理した胚では正常だった。

Bud 期で加温処理した胚についてさらに前・中脳マーカーの *otx2*、MHB で発現する *wnt1* 及び *her5* について、体節形成終了期 (prim-5) での発現を検討した (Fig. 32)。*otx2* は中脳での発現が顕著に低下し、間脳での発現もやや弱くなった (32%, n=19; Fig. 32B, B')。MHB で発現する *wnt1*、*her5* についても低下が見られた (*wnt1*, 58%, n=19; *her5*, 65%, n=20; Fig. 32D, D', F, F', G, G')。*her5* についてはさらに間脳背側に相当する領域で異所的な発現も見られている。*otx2* の染色胚については、発現レベルから正常胚と低下胚の 2 群にわけ genotyping したところ、発現が高い胚は 13 個体中 2 個体のみが *hsp-gbx2*<sup>-/-</sup>であったのに対し、発現が低い胚は全て *hsp-gbx2*<sup>+/-</sup>であったことから、発現低下は *hsp-gbx2* に依存することが確認された (data not shown)。

これらの結果から、*gbx2* の強制発現は中脳・MHB/峡部異常を特異的に起こすこと、この *gbx2* 効果は bud 期で最も顕著であることが遺伝子レベルでも示された。

### 脳形成過程において *gbx2* 強制発現が *otx2* の発現に示す抑制効果の変動

発生の進行に伴った *gbx2* 誘導効果の強さの変化に関する分子メカニズムとして、*gbx2* 下流遺伝子の *gbx2* 作用に対する応答能の変化が考えられる。*gbx2* の下流の因子の 1 つとして推測されているのは *otx2* であるが (Inoue et al., 2012)、これについて、shield 期から 18 体節期までの異なる時期に加温処理を加えて 2 hph で固定し、発現を検討した (Fig. 33)。すると、どの時期で処理した胚においても、約半分で発現の低下が観察され、特に bud 期での処理胚では完全に消失していた (Fig. 33F, F')。誘導時期が bud 期から早くなる、あるいは遅くなるほど発現低下度は小さくなり、後期体節期ではほとんど発現低下が見られなかった。Shield 期、bud 期、6 体節期で加温処理した胚について、*otx2* の発現レベルから正常胚と低下胚の 2 群にわけ、一部を genotyping したところ (Fig. 33M)、発現が高い胚は全て *hsp-gbx2*<sup>-/-</sup>、低い胚は全て *hsp-gbx2*<sup>+/-</sup>であった。すなわち *otx2* は、*gbx2* の強制発現に依存して発

現が抑制されており、*gbx2* への応答性は bud 期で最も高く、その後発生が進むにつれて低下することが示された。

### 加温処理後経過時間と遺伝子の発現変動について

上述のように、*gbx2* の強制発現は bud 期において MHB 形成に強い影響を示すことから、bud 期において *gbx2* を強制発現させた胚における各種脳領域マーカーの発現変動について経時的に検討した (Fig. 34)。まず、Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> 魚を野生型魚と交配し、子孫胚を bud 期で 37°C, 30 分間加温処理した。0, 1, 2 hph でそれぞれ固定し、*otx2*、*wnt1*、*pax6*、*six3b*、*pax2a*、*fgf8a* の発現を検討したところ、*otx2* は 0 hph ですでに大きく発現の低下した胚があり、1 hph で完全に消失していた (Fig. 34A, A', C, C', F, F')。 *wnt1* (MHB)、*pax6* (前・中脳) については 1 hph で発現低下が見られ、2 hph でそれが顕著になった (Fig. 34D, D', E, E', G, G', H, H')。 *six3b* (前脳) 及び *pax2a* (MHB) の発現は 2 hph で低下が確認された (Fig. 34N, N', O, O')。 *fgf8a* については 2 hph でも発現変化が見られなかった (Fig. 34K, M, P)。発現レベルに違いがある場合、正常胚と低下胚の 2 群に分けた後 genotyping をしたところ、各遺伝子の発現低下は *hsp-gbx2* に依存することが確認された (Fig. 35)。

以上のように、*gbx2* の強制発現に対する応答のタイミングは各遺伝子によって異なる。特に *otx2* が速やかに反応することから、やはりこの遺伝子は *gbx2* の直接の下流遺伝子の有力な候補と考えられた。

### *gbx2* 下流遺伝子の網羅的同定

*gbx2* の bud 期での強制発現で発現が変動する遺伝子を網羅的に解析するため、bud 期で 35°C, 15 分間の加温処理を行った胚から直後に RNA を抽出し、*hsp-gbx2* の有無で 2 群にわけ、発現変動をマイクロアレイ解析により比較した (GeneChip Zebrafish Genome Array, Affymetrix; Fig. 36)。このアレイ上には 15,617 プローブが並んでおり、そのうち *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で発現があり且つ *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で低下したプローブ数は 126、*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で発現があり、*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で上昇したのは 141 であった (Fig. 37, Table 22, 23)。また、bud 期で 37°C, 30 分間処理した胚から 2 時間後に RNA を抽出して同様に発現変動を比較したところ、*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で発現があり且つ *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で減少したプローブ数は 235、*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で発現があり、且つ *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> で上昇したのは 85 であった (Table 24, 25)。1 回目と 2 回目の結果で共に発現が低下したプローブ数は 18、共に発現が上昇したプローブ数は 5 であった (Table 26)。

発現変動が顕著だった遺伝子 (*snai2*, *acp5a*, *hoxi1*, *mxtx1*, *sepp1a*)、あるいは脳形成に関係する発現変動遺伝子 (*hoxa3a*, *lhx8a*, *neurog1*, *zic3*, *otx1b*, *otx2*) について、実際に発現を確認した。まず、35°C, 15 分間の加温処理後 0, 1, 2hph において WMISH 法により発現を確認した (Fig. 38)。*otx2* の発現は前述の通り 0 hph から顕著に低下していた (Fig. 38Q, Q', U, U', W, W')。また、*otx1b* は 2 hph で発現が減少した胚が見られ、Genotyping により *hsp-gbx2* に依る結果ということが示された (Fig. 37V, V')。しかし、その他の遺伝子については、WMISH 法では差異が見られな

かった。

一方、加温処理を行った上 (37°C, 30 分間)、2 hph で遺伝子発現を再検討したところ (*hoxa3a*, *snai2*, *acp5a*, *foxi1*, *neurog1*, *sepp1a*, *zic3*, *her5*, *hesx1*, *klf2a*, *otx1b*; Fig. 39)、*otx1b* に加え (Fig. 39K, O)、*her5*、*hesx1*、*klf2a* の 3 遺伝子でも発現の低下が見られた (Fig. 39H-J, L-N)。*her5* と *hesx1* について処理後経過的に発現解析を行ったところ (Fig. 40)、*her5* は直後 (0 hph) からすでに発現低下が見られ (Fig. 40A, A', B, B')、*hesx1* は 1 hph 以降で発現が低下した (Fig. 40F, F', G, G')。

次に、脳形成への関与が予想され、かつ発現低下がマイクロアレイで見られた遺伝子 (*neurog1*, *otx1b*, *otx2*, *foxi1*, *her5*, *hoxb5b*) または発現上昇が見られた遺伝子 (*hoxa3a*, *pou3f2*, *hoxc6b*, *lhx8a*, *slc6a3*) について、37°C, 30 分間の処理後、0, 1, 2, 3 hph で胚を個別に回収し genotyping によりプールした *hsp-gbx2*<sup>-/-</sup>胚と *hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>胚の間で、Q-PCR 法により発現量を定量的に比較した (Fig. 41)。その結果、マイクロアレイで発現低下遺伝子とされた 6 遺伝子すべてで実際に発現の有意な低下が見られ、発現上昇遺伝子とされた 5 遺伝子も全て有意に発現が上昇した。

以上のように、マイクロアレイにより、多数の遺伝子について、*gbx2* の強制発現により発現が変動する遺伝子が示されたが、その多くで、WMISH、Q-PCR により発現が実際に変動することが確認された。

## 考察

Gbx ホメオドメインタンパク質ファミリー遺伝子は、*Drosophila* ホメオボックス遺伝子群の脊椎動物関連遺伝子として、マウス (Bulfone et al., 1993)、ヒト (Matsui et al., 1993) より RT-PCR によって同定され、*Gbx2* は後脳前方で特異的に発現すること (Bulfone et al., 1993)、前方神経板で発現する *Otx2* と発現境界を形成すること (Wassarman et al., 1997) が見出された。その後、ツメガエル (Von Bubnoff et al., 1996)、ニワトリ (Niss and Leutz, 1998) といった他の脊椎動物でも次々と同定され、ゼブラフィッシュにおいても、*Drosophila Antennapedia-type homeobox* として cDNA がクローン化され (Kikuta et al., 2003)、これと独立して Rhinn et al. によっても報告されている (Rhinn et al., 2003)。ゼブラフィッシュ *Gbx2* は 342 アミノ酸配列からなるタンパク質であり、他種の *Gbx2* アミノ酸配列と全体では 65-72% の相同性を持つ。*Gbx2* 内には、特に種間で保存性の高い 4 つの保存配列領域 (CD1, CD2, CD3/ホメオドメイン, CD4; Fig.16) を持つことが明らかとなっている (Kikuta et al., 2003)。このうち N 末領域に存在する CD1 には、転写抑制能をもつとされる Eh1 様配列 (Heimbucher et al., 2007) 及び転写活性能を持つとされる高 Pro 配列が含まれる (Bouillet et al., 1995)。

*gbx2* の胚発生における役割については、まずマウス胚で詳細な Loss-of-function、そしてニワトリ胚で Gain-of-function 実験が行われた。特にマウスでは、*Gbx2* は原腸形成初期から後方神経系で広く発現し、*Otx2* と抑制的に相互作用して MHB の位置の決定を行うことが明らかとなっており、ニワトリでも機能はほぼ同様とされる (Broccoli et al., 1999; Katahira et al., 2000; Millet et al., 1999)。ゼブラフィッシュでもまた、*gbx2* アンチセンスモルフォリノオリゴ (*gbx2* MO) の微小注入によるノックダウン解析や、mRNA を用いた強制発現実験などが行われており (Kikuta et al., 2003)、*gbx2* が前・中脳形成を抑制すること、マウスやニワトリの場合と異なり、原腸形成後期以降に後脳前端で発現し、MHB の峡部への発生に必要であることが明らかとなっている。ゼブラフィッシュの場合、原腸形成期に MHB の決定に関わるのもう 1 つの *gbx* 遺伝子である *gbx1* であると考えられる。

本研究では、*gbx2* の脳形成制御における役割、それに関わる分子内領域を明らかにするとともに、各発生時期における *gbx2* の役割の詳細な検討を行い、最終的に *gbx2* を中心とした脳形成制御因子ネットワークの解明を目指した。

### **Gbx2 の強制発現は発現レベルによって異なる効果をもたらす**

先述の通り、*gbx2* を高レベル (30 pg/胚) で強制発現した場合、体節形成終了期において前脳から中脳、峡部にかけての形成不全が観察される。これは、前脳で発現する *six3b*、前・中脳で発現する *otx2*、MHB で発現する *wnt1*、*pax2a*、*fgf8a* の発現がそれぞれ低下していることから示される。一方で、低レベル (5 pg/胚) で強制発現した場合には、峡部の欠損が主として生じ、前・中脳には大規模な異常は起こ

らない。遺伝子レベルにおいては、前脳での *six3b* の発現はほぼ正常であり、*otx2* の発現は低下するものの残存するほか、MHB での *wnt1*、*pax2a*、*fgf8a* の発現は位置が前方にシフトするがほぼ正常である。従って、これまでに報告されていた通り、*gbx2* は前・中脳の形成に抑制的に働くこと、特に峡部/MHB は *gbx2* への感受性が高いことが改めて示された。なお、低レベルでの強制発現胚において、峡部欠損の形態と MHB 遺伝子の発現パターンは必ずしも対応しなかった。実際、峡部形成に関与するとされる *gamma1 laminin* の欠失変異体 *sleepy (sly)* では、峡部構造の形成が不完全であるものの MHB での *pax2a* 及び *eng3* の発現が正常であり、MHB の位置決定と峡部構造の形成とは完全には一致していないと考えられる (Gutzman et al., 2008)。両者を結びつける遺伝子機構は未だ報告がなく、*gbx2* は、MHB の形成だけでなく峡部構造の形成にも関与する可能性が示唆される。

初期神経パターンが決定するとされる原腸形成終了期 (bud 期) でもマーカー遺伝子の発現パターンを確認したところ、体節形成終了期で見られた結果と同様、高レベルの強制発現胚では前方神経マーカー及び MHB マーカーの発現が低下していた。興味深いことに、MHB での *fgf8a* の発現はこの時期では拡大していた。この発現パターンの変化については、(1) *fgf8a* は *gbx2* に直接制御されており、bud 期前後と体節形成期で異なる MHB エンハンサーが存在し、Gbx2 は前者に対して活性化に、後者に対して抑制的に働くという可能性、(2) *fgf8a* は他の MHB 遺伝子によって制御されており、bud 期で MHB が正常に形成されなかった結果、体節形成期以降の発現が維持されなかった可能性、が考えられる。いずれにせよ、MHB の分子実体であるとされる *fgf8a* の発現パターンが乱れていることから、*gbx2* はこの時期から既に MHB 形成に影響しているといえる。なお、80% epiboly 期における *gbx1* の発現も、高レベル *gbx2* の強制発現により低下していた。*gbx1* は *gbx2* のパラログ遺伝子であり、*gbx2* と同様後脳前端に発現するが、*gbx2* の発現が上昇する bud 期以降で発現領域が後方菱脳節へ移行する (Kikuta et al., 2003)。今回の結果から、*gbx2* は *gbx1* に対して抑制的に働いていることが示されたが、これは *gbx1* の発現領域の変化が内在 *gbx2* に依ることを示唆する。低レベルでの *gbx2* 強制発現胚では、*otx2* の発現が若干低下していたが、それ以外の前・中脳マーカー及び MHB マーカーの発現はほぼ正常であった。これは体節形成終了期における遺伝子発現と基本的に一致しており、やはり、低レベルの *gbx2* 強制発現では大規模な発現変化は起こさないこと、*otx2* は *gbx2* に対して極めて感受性が高いことが示された。

### 脳形成における Gbx2 の主な活性

*gbx2* は、ゼブラフィッシュ及び *Xenopus* の胚を用いた Gain-of-function 実験により、前脳及び中脳全体の形成に抑制的であることが知られる。その際、Gbx2 は転写抑制因子として機能すると予想された (Tour et al., 2002)。その一方で、培養細胞系においては転写活性化にも働くという報告がある (Kowenz-Leutz et al., 1997)。今回、Engrailed 転写因子の転写抑制領域または VP16 転写因子の転写活性化領域と Gbx2 ホメオドメインを融合させた遺伝子 (各々 *en-gbx2* または *vp-gbx2*) の、ゼブ



ラフィッシュ胚への mRNA 導入による強制発現実験により、野生型 *gbx2* が *en-gbx2* の脳形成への効果と形態的、遺伝子的に類似していることが示された。一方、*vp-gbx2* は基本的に先の 2 遺伝子とは効果が逆であった。すなわち、少なくとも初期脳形成においては、*gbx2* は主に転写抑制的に働くと推定される。

なお、金井による先行研究では、Gbx2 ホメオドメイン及び CTR を VP16 活性化ドメインにつないだ遺伝子 (*VP16-gbx2HDC*) を活性型 Gbx2 遺伝子として用いたが (金井, 2003)、今回用いたのは Gbx2 ホメオドメインのみに VP16 配列をつないだものである。しかし、得られた結果は基本的に一致しており、CTR の有無は EnR の抑制効果に大きな影響を与えていない。また、抑制型 Gbx2 として金井が用いた *EnR-Gbx2HD* 内の En 配列内にはアミノ酸置換がある事が今回判明したが、今回用いた *en-gbx2* の方が効果は多少弱いものの、両者で得られた結果は基本的に一致していた。従って、今回の *en-gbx2/vp-gbx2* を用いた結果は、金井による実験で残っていた疑問に答えると共に、*in vivo* における *gbx2* の抑制効果に関する以前の観察を確認したと言える。

### ゼブラフィッシュ Gbx2 の結合 DNA 配列の特定

Gbx2 タンパク質はホメオドメイン型転写因子と推定されながら結合 DNA 配列に関する知見は乏しく、ニワトリ血球培養細胞において cMGF プロモーター配列にある “ATTA” に結合し白血病発症に関与すること (Kowenz-Leutz et al., 1997)、ヒト *IL-6* のプロモーター内にある “ATTA” 配列に結合し前立腺ガンの形成に関与すること (Gao et al., 2000) しか報告されていなかった。しかし近年、マウス *Otx2* の前・中脳エンハンサー内にある “TAATTA” に結合し、*Brn* と拮抗的に働くことで転写を抑制すること (Inoue et al., 2012)、マウス *Lmo3* の上流領域にある 2 カ所の “CTAATTAG” に結合して視床の軸索伸長に関与するという (Chatterjee et al., 2012)、ヒトの神経冠細胞や内耳形成に関与する複数の遺伝子について、その近傍領域に位置する “ATATAT” または “TTTATA” へ結合することなどが (Roeseler et al., 2012) 相次いで報告された。

今回 Gbx2 タンパク質との結合実験に用いたゼブラフィッシュ *fgf8a* の S4.2 エンハンサーは、*fgf8a* 遺伝子の下流+14440 bp から+15748 bp に位置する約 1.3 kb の DNA 配列である。Inoue らによる胚でのレポーター解析により、S4.2 領域には 10 体節期以降で MHB (後脳前端)、眼柄、耳胞、鼻原基など内在 *fgf8a* の発現領域での転写活性化能があることが明らかとなっている (Inoue et al., 2008)。この実験で、ゼブラフィッシュ Gbx2 がマウス *Otx2* における報告と同様 S4.2 領域内の “TAATTA” を含む 30 bp の配列に結合することを競合実験により示した。さらに、配列に mutation を加えると競合活性が著しく低下したことから、この 6 塩基配列に特異的に結合すると考えられる。

### Gbx2 は S4.2 活性に対して抑制的に働く

*gbx2* の転写調節活性について、培養細胞を用いた luciferase アッセイによりさら

に解析した。今回、用いたレポーター遺伝子は S4.2 制御下にホタル luciferase 遺伝子を置いたものであるが、このレポーター遺伝子のみを細胞に導入したときに、バックボーンベクターの導入よりも大きく luciferase 活性が上昇したことから、S4.2 領域は *in vivo* と同様 *in vitro* でも転写活性化能を持つことが確認された。ここに *gbx2* 発現プラスミドを共導入すると、P19 細胞、HEK293T 細胞どちらについても量依存的に S4.2 活性を抑制した。また、転写抑制型 *gbx2* (*en-gbx2*) または転写活性化型 *gbx2* (*vp-gbx2*) を共導入した場合、それぞれ量依存的に S4.2 活性は低下ないし上昇したが、この結果は、胚での強制発現実験の結果と一致し、やはり Gbx2 は転写抑制因子として働くことが *in vitro* においても示された。

なお、HEK293T 細胞における実験結果は、P19 細胞を用いて得られた結果と基本的に一致するが、異なる点もある。最も多量の *gbx2* を共導入した場合、S4.2 に対する転写抑制能は見られなくなり、むしろ活性化に働いた。その作用機序は不明であるが、培養細胞株により内在転写因子の発現状況、エピジェネティックな制御など、細胞の内部環境が異なり、S4.2 の制御機構もしくは Gbx2 の作用がこの影響を受けていることを示唆する。

また、今回の実験では、他遺伝子由来プロモーター (ヒト *interferon-β* プロモーター) 及び *fgf8a* 自身のプロモーターを用いて解析したが、基本的に結果は一致したことから、luciferase 活性の変化は S4.2 に対する効果によるものと考えられる。

### ***fgf8a* の MHB における発現を制御する遺伝子機構の *in vitro* での解析**

引き続き、MHB 遺伝子である *pax2a* と *fgf8a* による、S4.2 を介した *fgf8a* の発現制御について、同様に培養系で検討した。レポーター遺伝子と *pax2a* とを共導入すると、P19 細胞、HEK293T 細胞どちらにおいても S4.2 の活性は上昇した。これは、S4.2 の転写活性化能に Pax が関与するという Inoue らの報告と一致する。さらに、P19 細胞に関して、*pax2a* と同時に *fgf8a* を導入すると S4.2 活性が大きく上昇したことから、*pax2a* と *fgf8a* は協調して転写活性化に働くことが示唆される。*fgf8a* 発現に対する *fgf8a* と *pax2a* の関与については、ゼブラフィッシュ *fgf8a* 変異体 (*ace*) 胚において体節形成期以降で *fgf8a* 発現が消失すること (Reifers et al., 1998)、*pax2a* 変異体 (*noi*) においても体節形成期以降で *fgf8a* が消失すること (Lun and Brand, 1998; Reifers et al., 1998) と対応する。*fgf8a* がどのような仕組みで S4.2 活性を制御するのかは明らかとなっていないが、*pax2a* との相乗効果を考えると、*fgf8a* の作用は *pax2a* を介しておらず、*pax2a* とは並行した別経路によると推定される。なお、内在の *pax2a* の発現が中脳後端から後脳前端にかけてあるのに対し、*fgf8a* 発現及び S4.2 発現は後脳前端に限定されることから、S4.2 活性制御に *pax2a* が必要としても、中脳での転写活性を抑制する他の因子が存在することが予想される。

*pax2a* 及び *fgf8a* と共に *gbx2* を共導入する実験より、*gbx2* は *pax2a* 単独ないし *pax2a* と *fgf8a* による相乗的な S4.2 活性化能を強く抑制した。このことは、*gbx2* が他の転写因子の転写活性化作用をも阻害することで転写抑制因子として働くことを

示唆する。今後、*wnt*、*en* など他の MHB 遺伝子のエンハンサーについても、Gbx2 の転写調節能を検討する必要があるだろう。

### 前・中脳形成抑制活性を担う Gbx2 内の機能領域の検討

Gbx2 タンパク質の脳形成制御機能に関わる分子内領域の探索を目的として、N 末又は C 末領域を欠失させた人工 *gbx2* 遺伝子の強制発現効果の検討が以前に行われており (菊田, 2003)、CD1 と CD2 を含む NTR、CD4 にあたる CTR のいずれを欠失させても *gbx2* の前・中脳抑制効果が弱くはなるが残存した。このことは NTR と CTR が各々不完全ながら *gbx2* の前・中脳形成阻害作用を担うことを示唆する結果が得られている。また、ホメオドメイン自体は必要であるが、単独では機能せず、NTR 単独も機能がなことが観察されている。しかし、この際に作製された *gbx2* の N 末端には Myc tag が付加されていたが、Myc tag に関しては転写因子の活性に影響を与えることがあると報告されており (Ferreiro et al., 1998)、これが強制発現実験の結果に干渉した可能性があったため、本実験では、FLAG tag を用いて新たに作製した欠失型 *gbx2* の強制発現実験を行った。

まず、FLAG 標識した Gbx2 は野生型 Gbx2 よりも活性が低下するものの、同様の前・中脳形成の抑制を示すことを確認した。また、以前作製された Myc 標識欠失変異体と対応する FLAG 標識欠失変異体 (*gbx2-HD*, *gbx2-ΔN*, *gbx2-ΔC*, *gbx2-ND*) はほぼ同じ効果を示した。すなわち、NTR、CTR を欠失させた場合のいずれも、*gbx2* は低いながらも前・中脳抑制活性を示した。従って、これらの残存抑制活性は付加した tag に依るものではなく、実際に *gbx2* 内の複数の領域に起因することが改めて示された。

CD1 内の Eh1 様配列だけを欠失させたところ、N 末領域全体を欠失させた場合と同程度に前・中脳抑制活性が低下した。この活性は CTR を欠失させると失われることから、NTR 内の主要活性配列は Eh1 様配列であると考えられる。近年、メダカ胚において、Gbx2 を熱感受性プロモーターで原腸形成期に誘導することで、Otx2 発現の後方境界が前方にシフトすることが観察された (Heimbucher et al., 2007)。この効果は、Eh1 様配列を欠失させた Gbx2 では認められず、Eh1 が Gbx2 による Otx2 発現の抑制に必要である事が示されており、Eh1 様配列の重要性については一致している。ただし、本研究では Eh1 様配列と別に CTR にも類似活性を見ており、完全には一致していない。今後、NTR/Eh1 と CTR の機能の比較、検討をさらに進める必要がある。なお、Heimbucher らは同時に、Eh1 様配列と Tle4 が結合することが必要であることも見出しており、ゼブラフィッシュ Gbx2 も同様の作用機構を持つことが予想される。

### Gbx2 に内在する背側化活性

CD1 領域内の高 Pro 配列の欠失した *gbx2* の強制発現では、本来の前・中脳抑制機能への効果は弱く、むしろ原腸形成期において強い背側化が観察された。このことは、Gbx2 に背側化活性が内在することを示唆する。実際、正常 *gbx2* の強制発現

胚では遺伝子レベルで背側化が見られており、さらに **Engrailed** 転写抑制ドメインを持つ抑制型 **gbx2** (*en-gbx2*) はさらに強い背側化活性を示した (Figs. 7, 18)。Engrailed 転写抑制ドメインの活性も Eh1 に依存しており (Smith and Jaynes, 1996)、Eh1 様配列は前・中脳抑制の他に Gbx2 の背側化活性も担っていると考えられる。同様の背側化活性は **gbx2** の相同遺伝子である **gbx1** の強制発現でも観察された (Fig. 18)。Gbx2 の種間保存配列のうち、Eh1 様配列、NCR、CD3/ホメオドメイン、及び CD4 配列は Gbx1 にも存在するが (Fig.41)、高 Pro 配列及び CD2 は Gbx1 では見られない。CD2 を含む領域を欠失させた **gbx2** (*gbx2- $\Delta$ Lin1*) では背側化効果が見られなかったことを踏まえると (Fig. 19)、高 Pro 配列が Gbx2 に内在する背側化能を通常は抑制している可能性がある。

### NCR 配列と中脳・峽部について

NCR 配列及びその内部にある IVR 配列を欠失させた **gbx2** (*gbx2- $\Delta$ NCR*) の強制発現では、前脳は正常に形成されるのに対し、中脳の形態異常と峽部の欠損が観察された。これは、終脳・間脳で発現する *emx3*、*dlx2a*、*six3b* の発現が正常であった一方 (Fig. 22)、中脳における *otx2* の発現が低下し (Fig. 22)、及び MHB で発現する *wnt1*、*eng2a*、*pax2a*、*fgf8a* の発現も低下していたことから (Fig. 23)、遺伝子レベルでも裏付けられる。また、*gbx2- $\Delta$ NCR* 強制発現胚の中脳における *elavl3*、*atoh1a*、*pvalb7* の発現パターンの変化は、中脳領域の小脳化を示唆する。

峽部形成が阻害されるケースは、ゼブラフィッシュ胚でこれまでにいくつか知られる。(1) モルフォリノオリゴを用いた **gbx2** 機能阻害実験でも峽部の欠損が見いだされている。しかしこのケースでは *gbx2- $\Delta$ NCR* の強制発現胚と異なり、中脳での *otx2* の発現低下は見られていない (Kikuta et al., 2003)。また、**gbx2** のノックダウンでは中脳から小脳までが退縮するのに対し (Kikuta et al., 2003)、*gbx2- $\Delta$ NCR* の強制発現ではむしろ中脳様構造の膨出が顕著である等、形態的表現型にも違いがある。したがって、*gbx2- $\Delta$ NCR* が内在 Gbx2 に対してドミナントネガティブに働く可能性は低い。(2) また、前述のように **gbx2** を低レベルで強制発現させた場合にも峽部欠損が見られる。この場合、*otx2* 発現は中脳領域でも弱いながら確認されており、*pax2a*、*fgf8a*、*wnt1* などの MHB マーカーの発現も保持される上、中脳領域の顕著な膨出は見られないなど、表現型は異なるように思われる。また、*gbx2- $\Delta$ NCR* の強制発現量を増加しても、野生型 **gbx2** の強制発現効果を再現しないことから (data not shown)、従って、*gbx2- $\Delta$ NCR* の効果は **gbx2** の活性低下のためとは言えない。(3) すでに言及したように、*gbx2- $\Delta$ NCR* 強制発現胚の中脳から峽部にかけての形状は *ace* 胚のものによく似ている。*ace* 胚の場合、中脳が後方に拡大し、小脳が消失するとされるが (Jászai et al., 2003)、*gbx2- $\Delta$ NCR* 発現胚の場合、*otx2* の発現が中脳領域で消失すること、逆に小脳マーカーの発現が中脳様領域に拡大することから、両者の表現型は分子レベルではまったく異なる。(4) この他、*pax2a* 及び *pou2* の欠損変異体 (各々 *no isthmus/noi* と *spiel-ohne grenzen/spg*) でも峽部消失が知られるが (Burgess et al., 2002; Lun and Brand, 1998)、いずれの場合も中脳様領域の

膨出は知られていない。遺伝子レベルでの検討がさらに必要であるが、少なくとも形態的には *gbx2-ΔNCR* の強制発現効果と区別される。

*gbx2-ΔNCR* 強制発現と低レベル *gbx2* 強制発現の効果の最も大きな違いは、*wnt1* 発現への効果であった。低レベル *gbx2* 導入胚では、MHB での *wnt1* 発現は、bud 期でほぼ正常であり、26 hpf においても維持されていた。一方、*gbx2-ΔNCR* 強制発現による中脳・峡部異常胚においては、bud 期、26 hpf どちらも *wnt1* の発現が大きく低下していた。MHB では、*wnt family* のうち *wnt1* (Molven et al., 1991)、*wnt3a*、*wnt10b* (Krauss et al., 1992)、*wnt8b* (Kelly et al., 1995) の発現が確認されている。このうち *wnt1* は脊椎動物において MHB の分子実体として重要な因子であり、マウス *wnt1 mutant* では、峡部とともに中脳・後脳の広範囲の形成異常が知られている (McMahon and Bradley, 1990)。ゼブラフィッシュにおいては、*wnt1* 変異体はマウスで報告されるほど大規模な MHB 異常を示さず、*wnt1* 及び *wnt10b* の二重変異体ですら峡部形成は正常である (Lekven et al., 2003)。これは、MHB 形成において *wnt1* のパラログ遺伝子であり発現領域を同じくする *wnt10b* 及び背側 MHB で発現する *wnt3a*、*wnt8b* が相補的に働いているためだとされる。ただし、*wnt1/wnt10b* 二重変異体における MHB 遺伝子の発現は中期体節期から減少し始め、体節形成終了期では *pax2a*、*en2* などの腹側の発現のみが消失する。一方で *fgf8a* の発現は正常なものが多いが、胚によっては腹側で減少ないし完全に消失する (Lekven et al., 2003)。また、*wnt3a* のみをノックダウンしても峡部形成は正常である。しかし、これら 3 種の *wnt* 遺伝子の同時欠失で初めて峡部が形成されなくなるほか、*pax2a*、*fgf8a*、*eng2* といった MHB 遺伝子の発現が低下する。形態は、峡部が欠失するなど *gbx2-ΔNCR* の強制発現胚と似ており、MHB 遺伝子の発現低下という類似性も見られている。その一方、中脳の *otx2* の発現が維持されることなどから中脳、第 1 菱脳節の拡大及び小脳の消失が起こっているとされている。今後、*gbx2-ΔNCR* の強制発現胚においても、中脳及び前方菱脳節の形成について分子レベルでより詳細に解析し比較する必要があるだろう。

さて、IVR または NCR を欠失した *gbx2* 強制発現では、形態的、そして分子的に見て、前脳、小脳、そしてその後方の中枢神経系はほぼ正常に形成される。野生型 *gbx2* が前・中脳の形成に対して抑制効果を持つことを考えると、IVR 配列が *gbx2* の前脳形成抑制に関与する可能性がある。この場合、中脳形成抑制については NCR のうち IVR 以外の領域が担っていることになる。ただし、*gbx2-ΔNCR* 強制発現でも前・中脳抑制活性が完全になくなるわけではないため、前脳抑制活性は NCR 配列のみに局在するわけではないと考えられる。

IVR 配列に既知のコンセンサス配列はなく、今のところ、作用機構は不明である。今後、IVR 配列と相互作用する因子を特定することで、脳領域における複雑な Gbx2 の作用メカニズムを解明することができるかもしれない。

## 胚発生の進行と Gbx2 感受性の変化

時期特異的な Gbx2 の効果については、glucocorticoid レセプターのホルモン結合

領域を Gbx2 ホメオドメインの N 末側に融合させた *gbx2-GR* 遺伝子を用いて検討が行われた (金井, 2003)。この実験では、*gbx2-GR* mRNA 導入胚を合成 glucocorticoid である dexamethasone で処理して融合タンパク質の核移行を誘導し、その脳形成への影響が調べられている。この結果から、初期脳形成での *gbx2* のパターンニング機能に対する胚の感受性は、体節形成期以降は失われるとされたが、この時期に胚内で実際に *gbx2* が活性化されているかは確認されていない。本研究においてはまず、heat shock プロモーターを繋いだ *gbx2* 発現コンストラクト (*hsp-gbx2*) を作製し、その有用性を検討した。

まず *hsp-gbx2* DNA のマイクロインジェクションによる導入胚において、bud 期で加温処理時間を変えて *gbx2* の異所的な発現誘導を調べた結果から、処理時間は 30 分間で十分であると考えた。なお、野生型胚は加温処理を行ってもほとんど正常であることから、加温処理操作による発生異常は軽微であると考えられる。一方で、加温処理をしない *hsp-gbx2* 導入胚でも一部で死亡胚が見られるが、低レベルながら *gbx2* が発現したことによる可能性がある。いずれにしろ、こうした非特異的効果は *hsp-gbx2* の加温誘導依存的効果に比べて無視できると考える。

本研究では、さらに *hsp-gbx2* 遺伝子をゲノム内に持つ Tg 魚系統、Tg:*hsp-gbx2* を作製し、この系統魚の子孫胚での *gbx2* 誘導特性を検討した。まず、shield 期、bud 期及び 18 体節期において加温処理を行い、*in situ* hybridization 法及び定量的 PCR 法により *gbx2* の発現を調べた結果から、導入遺伝子由来の *gbx2* 発現は胚体全体で強く見られ、その発現上昇率は野生型に比べ最大で 149 倍にも上ることが示された。さらに、同じく bud 期に加温処理した胚について、処理後経時的な *gbx2* 発現の変化をやはり *in situ* hybridization 法及び定量的 PCR 法で確認したところ、誘導された *gbx2* mRNA の発現量は、加温処理が終了すると速やかに減少することが示された。以上のことから、本 Tg 系統を用いることで、*gbx2* を、少なくとも shield 期から 18 体節期までについては、一過的に過剰発現誘導できることが観察された。

そこで、引き続き、Tg:*hsp-gbx2* を用いて異なる発生時期に *gbx2* を加温誘導し、この遺伝子に対する胚の応答能の検討を行った。その結果、*gbx2* の効果が最も顕著だったのは、形態的にも遺伝子発現から見た領域化でも、原腸形成終了期前後だった。また、その効果は基本的に MHB、そして峡部に限定されており、mRNA 導入と違い、前脳領域では顕著な異常は見られていない。これは、メダカ胚を用いた同様の実験結果とも一致する (Heimbucher et al., 2007)。従って、*gbx2* の役割は、マウスの loss-of-function 実験でも示唆されたように峡部形成であり、mRNA 導入による前・中脳の広範な形成抑制は長期間作用することに起因すると考えられる。なお、検討した脳領域マーカーの中では *otx2* の発現低下がきわめて速く、直接の下流標的遺伝子であるのではないかと推定した。MHB 形成遺伝子の中で *wnt1*、*pax2a* についてはやはり発現低下が見られるが、*otx2* の反応に比べて遅いため、間接的に制御されている可能性がある。いずれにしろ、*gbx2* の機能発現に当たり、*otx2* への抑制効果が重要と考えられる。

一方、内在の *gbx2* が発現を開始する 90% epiboly 期以前に加温処理をした場合、

形態的効果、そして *otx2* に対する抑制効果は明らかに弱い。従って、初期神経外胚葉の応答能自体制御されており、原腸形成終了期に高くなるといえる。ただし、この時期でも弱いながら峡部形成に対する抑制効果、*otx2* に対する抑制効果が見られているが、同時期に発現している *gbx1* の機能を模倣しているためと考えられる。ただし、発現誘導された *Gbx2* タンパク質が残存しているための可能性もあり、今後の検討課題である。

原腸形成終了期前後、体節形成が進行するにつれて脳領域パターンニングにおける *gbx2* 感受性は低下したが、この結果は基本的にホルモン誘導型 *gbx2* を用いた実験結果と対応する (金井, 2003)。したがって、*gbx2* の峡部構造の形成作用、そして *otx2* の発現抑制作用に対する神経板の応答能は原腸形成終了前後に最も強いと言える。ただし、*gbx2* は体節形成期にも峡部発生に必要とされており (Kikuta et al., 2003)、峡部領域に限定された *gbx2* の作用が予想される。神経板、神経管に対する *gbx2* 作用の減弱の機能も不明であるが、一つの可能性として、*otx2* 遺伝子そのものの発現制御機構、特に epigenetic な常置が変化している可能性がある。

### Gbx2 強制発現から見た下流遺伝子ネットワーク

先述のように、*gbx2* はゼブラフィッシュを始めとして各種脊椎動物で脳発生に関与することが知られるが、その下流標的遺伝子については知見が少ない。*otx2* については以前より *gbx2* 下流遺伝子の候補と考えられてきており、上述した本研究でも *otx2* が直接 *gbx2* で制御されることが示唆された。その一方で、低レベルの *gbx2* 強制発現胚で見られる峡部に限られた異常などは *otx2* の抑制だけでは説明が難しいため、MHB 周辺での未知の候補遺伝子が予想される。本研究では、下流遺伝子の網羅的な同定を目指し、cDNA マイクロアレイを用いた解析を行った。

解析方法としては、Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型の交配で得られた胚に加温処理を加えた後、各胚の genotyping を行って Tg 胚と野生型胚の 2 群にわけ、それらの total RNA 抽出物を元に cDNA 調製した上、これらについてマイクロアレイ解析による発現比較を行った。1つの胚からゲノム DNA と RNA を抽出し、DNA を用いた genotyping に基づいて RNA をプールし発現比較を行う方法は今回新たに開発した手法である。これにより、野生型胚は Tg 胚と全く同様の処理を行ったものとなるため、*hsp-gbx2* の発現誘導について、厳密な対照がとれることになる。

マイクロアレイ解析の結果、予想通り、発現が低下していた遺伝子数は *gbx2* 誘導直後で 126、2 時間後で 235 であった。この中には直接抑制されると予想された *otx2* も含まれており、今回の実験系が予想通り動いていると考えられる。

これらのマイクロアレイ解析の結果を受けて、発現変動の大きかった遺伝子、及び脳領域に発現が確認されている遺伝子について、*hsp-gbx2* 誘導胚における発現を確認した。マイクロアレイの結果を受けて行った Q-PCR でも、調べた遺伝子の多くでマイクロアレイとほぼ同様の結果が得られており、マイクロアレイの結果は基本的に妥当と言える。その一方で、意外なことに、WMISH 法で明確な発現の違いが見られたのは *otx2*、*otx1b*、*her5*、*hesx1*、*klf2a* の 5 遺伝子のみであった。これは、マ

マイクロアレイ及び Q-PCR は定量的な解析方法であるのに対し、WMISH については発現変化を捉えるほどの定量性がないため、よほど大きな発現変化でないと確認できなかったためではないかと考えられる。また、WMISH では染色が見えない低レベル発現が実際には変化した可能性も考慮すべきであろう。

*otx1b* は初期原腸期から胚環及び胚盾で発現が始まり (Li et al., 1994; Mercier et al., 1995)、前方神経系では 75% epiboly 期以降に V 字型の発現が出現するが、90% epiboly 期から bud 期ではシャープな V 字型発現領域とさらに前方の U 字型の発現領域に分かれる。V 字型発現は中脳領域でその後端は MHB に相当し、U 字型発現は終脳に相当するとされる。加温処理 Tg 胚においては、特に中脳後方の発現、すなわち MHB の前方における発現が顕著に低下していた。従って、*otx1b* が特に MHB において *gbx2* の発現調節を受けていると言える。なお、*otx* 遺伝子には *otx2*、*otx1b* 以外にも *otx1a* (Mercier et al., 1995)、*otx5* が同定されているが、今回のマイクロアレイ解析で変動が観察されたのは前 2 種のみであった。なお、*otx5* は中期体節期以降の松果体でのみ発現が報告されており (Thisse et al., 2001)、初期神経発生には関与していない可能性が高い。一方 *otx1a* は *otx1b* と同様、bud 期前後では脳領域で V 字型・U 字型の発現をするにもかかわらず *gbx2* への応答能が違うことになるが (Mercier et al., 1995)、この時期において *pax2a* との二重染色による発現比較をすると、*otx1b* の発現後端は *pax2a* の発現後端と一致する一方、*otx1a* は *pax2a* の発現前端と一致する (Mercier et al., 1995)。従って、*gbx2* の強制発現に対して両者の応答能が異なる理由は、*pax2a* のような他の MHB 因子及び *gbx2* による相互作用かもしれない。

*her5* は bHLH 型転写因子であり、ゼブラフィッシュにおいては 90% epiboly 期から予定中脳後端で V 字型の発現が開始し、その後少なくとも 48 hpf まではほぼ同じ領域に発現するほか (Müller et al., 1996)、成体の中脳においても発現が報告されている (Chapouton et al., 2006)。細胞標識による運命追跡から、2 体節期における *her5* 発現細胞は 24 hpf において中脳視蓋及び中脳被蓋を構成し、間脳及び小脳には分化しないことが示されている (Müller et al., 1996)。*gbx2* の Tg 胚では加温処理直後から発現低下が認められ、1 時間後には完全に消失しており、その応答の速さ及び発現領域から、有力な *gbx2* 下流遺伝子の一つと言える。なお、MHB 領域には他にもいくつかの *her* 遺伝子が発現し、そのうち *her11 (him)* は *her5* とほぼ同様の発現パターンを示すが (Ninkovic et al., 2005; Webb et al., 2011)、今回のマイクロアレイ解析を基にした一連の実験では、*her5* の発現のみが低下する結果となった。

*hesx1* は paired-like homeobox 遺伝子の一つであり、mouse で初めて同定された後 (Hermesz et al., 1996)、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、*Xenopus*、ヒトなど他の脊椎動物でも同定された (Kazanskaya et al., 1997)。ゼブラフィッシュ胚での発現領域は詳細には調べられていないものの、50% epiboly 期から前方神経板での発現が見られ、体節形成期以降では予定終脳領域で発現しており、*gbx2* の発現領域とは重ならないように思われる。ニワトリ *Hesx1* の転写調節領域の解析より、*Otx2* の発現が *Hesx1* の発現に必要なであると示されていることから (Spieler et al., 2004)、*otx2*



の発現低下による間接的な発現低下である可能性も考えられる。

今回行ったマイクロアレイ解析で、発現が増大していた遺伝子数は直後、2時間後で各々141及び85であり、発現低下遺伝子の数と同等であった。改変型 *gbx2* mRNA を用いた強制発現実験、培養細胞を用いた *in vitro* の解析結果から *gbx2* は転写抑制的に働くと示唆されたことを踏まえると意外な結果であったが、一方、1回目においては発現減少のプローブ数よりも多かった。改変型 *gbx2* mRNA を用いた強制発現実験の結果から *gbx2* は転写抑制的に働くと示唆されたことをふまえると意外な結果であったが、一方、ニワトリの血球系やヒトの腎細胞においては転写活性化因子として働くと報告されている (Kowenz-Leutz et al., 1997; Roeseler et al., 2012)。これらの結果を考慮すると、*gbx2* は転写活性化にも抑制にも機能する可能性がある。実際、脳形成に関しても *pax2a* や *egr2b* 等の遺伝子に関しては発現の増大が観察されている。S4.2 領域を用いた luciferase アッセイからも、*gbx2* は量によって転写調節の効果が異なることが示唆された。また、細胞の種類、分化段階により細胞内で共存する転写調節因子、共益因子、あるいは遺伝子の epigenetic な環境が異なり、これらに依存して *gbx2* は転写調節能を変えている可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、実験手法や結果の議論など多くのことについてご教授し  
てください、研究活動以外にも様々な場面で叱咤激励して下さった、指導教官で  
おられる弥益恭教授には、この場を借りて深く御礼申し上げます。また、日々の研  
究活動全体を通してお世話になりました末光隆志教授、川村哲規講師の各先生に  
も、心より感謝いたしております。本テーマの前任研究者である菊田寛先輩、金井  
麻衣子先輩にも、すばらしいテーマとデータを残していただき、感謝いたしますと  
ともに、共同研究者の王詰さんにも感謝します。また、本研究に用いた *acerebellar*  
を御供与くださった小林麻己人博士 (筑波大学) ならびにプラスミドを御供与く  
ださった佐々木洋博士 (熊本大学)、日比正彦博士 (名古屋大学)、川上浩一博士 (国  
立遺伝学研究所) にも重ねてお礼申し上げます。

## 参考文献

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A. and Brûlet, P.** (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**, 3279–90.
- Adolf, B., Bellipanni, G., Huber, V. and Bally-Cuif, L.** (2004). *atoh1.2* and *beta3.1* are two new bHLH-encoding genes expressed in selective precursor cells of the zebrafish anterior hindbrain. *Gene expression patterns* **5**, 35–41.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T. a, Kintner, C., Evans, R. M. and Papalopulu, N.** (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* **124**, 373–9.
- Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dollé, P. and Chambon, P.** (1995). Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental dynamics* **204**, 372–82.
- Brand, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., et al.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123**, 179–190.
- Broccoli, V., Boncinelli, E. and Wurst, W.** (1999). The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature* **401**, 164–8.
- Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. R.** (1993). Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2* (*Tes-1*), *Gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *The Journal of neuroscience* **13**, 3155–72.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N. and Brand, M.** (2002). The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* **129**, 905–16.
- Chapouton, P., Adolf, B., Leucht, C., Tannhäuser, B., Ryu, S., Driever, W. and Bally-Cuif, L.** (2006). *her5* expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Development* **133**, 4293–303.
- Chatterjee, M., Li, K., Chen, L., Maisano, X., Guo, Q., Gan, L. and Li, J. Y. H.** (2012). *Gbx2* regulates thalamocortical axon guidance by modifying the LIM and Robo codes. *Development* **139**, 4633–43.

- Dworkin, S., Darido, C. and Georgy, S.** (2012). Midbrain-hindbrain boundary patterning and morphogenesis are regulated by diverse *grainy head-like 2*-dependent pathways. *Development* **139**, 525–536.
- Ferreiro, B., Artinger, M., Cho, K. and Niehrs, C.** (1998). Antimorphic goosecooids. *Development* **125**, 1347–59.
- Gao, A. C., Lou, W. and Isaacs, J. T.** (2000). Enhanced *GBX2* Expression Stimulates Growth of Human Prostate Cancer Cells via Transcriptional Up-Regulation of the Interleukin 6 Gene. *Clinical Cancer Research* **6**, 493–497.
- Gardner, C. A. and Barald, K. F.** (1991). The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. *Development* **113**, 1037–48.
- Gutzman, J. H., Graeden, E. G., Lowery, L. A., Holley, H. S. and Sive, H.** (2008). Formation of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary constriction requires laminin-dependent basal constriction. *Mechanisms of development* **125**, 974–83.
- Han, Y., Mu, Y., Li, X., Xu, P., Tong, J., Liu, Z., Ma, T., Zeng, G., Yang, S., Du, J., et al.** (2011). *Grhl2* deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28. *Human molecular genetics* **20**, 3213–26.
- Heimbucher, T., Murko, C., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Huber, A., Stebegg, R., Eberhard, D., Fink, M., Simeone, A. and Czerny, T.** (2007). *Gbx2* and *Otx2* interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors. *Molecular and cellular biology* **27**, 340–51.
- Hermesz, E., Mackem, S. and Mahon, K. A.** (1996). *Rpx*: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* **122**, 41–52.
- Houart, C., Westerfield, M. and Wilson, S. W.** (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788–92.
- Inoue, F., Nagayoshi, S., Ota, S., Islam, M. E., Tonou-Fujimori, N., Odaira, Y., Kawakami, K. and Yamasu, K.** (2006). Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish *fgf8* gene. *Development, Growth & Differentiation* **48**, 447–462.
- Inoue, F., Parvin, M. S. and Yamasu, K.** (2008). Transcription of *fgf8* is regulated by activating and repressive cis-elements at the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish embryos. *Developmental biology* **316**, 471–86.
- Inoue, F., Kurokawa, D., Takahashi, M. and Aizawa, S.** (2012). *Gbx2* directly restricts *Otx2* expression to forebrain and midbrain, competing with class III POU factors. *Molecular and cellular biology* **32**, 2618–27.

- Itasaki, N., Ichijo, H., Hama, C., Matsuno, T. and Nakamura, H.** (1991). Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium: engrailed expression and subsequent tectal polarity. *Development* **113**, 1133–44.
- Jászai, J., Reifers, F., Picker, A., Langenberg, T. and Brand, M.** (2003). Isthmus-to-midbrain transformation in the absence of midbrain-hindbrain organizer activity. *Development* **130**, 6611–23.
- Jiménez, G., Paroush, Z. and Ish-Horowicz, D.** (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes & development* **11**, 3072–3082.
- Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., Okafuji, T., Araki, I., Funahashi, J. and Nakamura, H.** (2000). Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. *Mechanisms of development* **91**, 43–52.
- Kazanskaya, O. V, Severtzova, E. A., Barth, K. A., Ermakova, G. V, Lukyanov, S. A., Benyumov, A. O., Pannese, M., Boncinelli, E., Wilson, S. W. and Zaraty, A. G.** (1997). *Anf*: a novel class of vertebrate homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis. *Gene* **200**, 25–34.
- Kelly, G. M., Greenstein, P., Erezyilmaz, D. F. and Moon, R. T.** (1995). Zebrafish *wnt8* and *wnt8b* share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development* **121**, 1787–99.
- Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y. and Yamasu, K.** (2003). *gbx2* Homeobox gene is required for the maintenance of the isthmus region in the zebrafish embryonic brain. *Developmental dynamics* **228**, 433–50.
- Kim, C., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S., Huh, T. and Miki, N.** (1996). Zebrafish *elav/HuC* homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience letters* **216**, 109–112.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* **203**, 253–310.
- King, M., Ndiema, M. and Neff, A.** (1998). Anterior structural defects by misexpression of *Xgbx2* in early *Xenopus* embryos are associated with altered expression of cell adhesion molecules. *Developmental dynamics* **212**, 563–579.
- Köster, R. W. and Fraser, S. E.** (2001). Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Developmental biology* **233**, 329–46.
- Kowenz-Leutz, E., Herr, P., Niss, K. and Leutz, A.** (1997). The homeobox gene *GBX2*, a target of the *myb* oncogene, mediates autocrine growth and monocyte differentiation. *Cell* **91**, 185–95.

- Krauss, S., Korzh, V., Fjose, A. and Johansen, T.** (1992). Expression of four zebrafish *wnt*-related genes during embryogenesis. *Development* **116**, 249–59.
- Kudoh, T., Tsang, M., Hukriede, N. A., Chen, X., Dedekian, M., Clarke, C. J., Kiang, A., Schultz, S., Epstein, J. A., Toyama, R., et al.** (2001). A gene expression screen in zebrafish embryogenesis. *Genome research* **11**, 1979–87.
- Lekven, A. C., Buckles, G. R., Kostakis, N. and Moon, R. T.** (2003). *wnt1* and *wnt10b* function redundantly at the zebrafish midbrain–hindbrain boundary. *Developmental Biology* **254**, 172–187.
- Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A. and Bally-Cuif, L.** (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nature neuroscience* **11**, 641–8.
- Li, Y., Allende, M. L., Finkelstein, R. and Weinberg, E. S.** (1994). Expression of two zebrafish orthodenticle-related genes in the embryonic brain. *Mechanisms of Development* **48**, 229–244.
- Lin, X., Swaroop, A., Vaccarino, F. M., Murtha, M. T., Haas, M., Ji, X., Ruddle, F. H. and Leckman, J. F.** (1996). Characterization and sequence analysis of the human homeobox-containing gene *GBX2*. *Genomics* **31**, 335–42.
- Liu, A. and Joyner, A.** (2001). Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annual review of neuroscience* **24**, 869–894.
- Lun, K. and Brand, M.** (1998). A series of *no isthmus (no)* alleles of the zebrafish *pax2.1* gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **125**, 3049–62.
- Martinez, S. and Alvarado-Mallart, R.-M.** (1990). Expression of the homeobox *Chick-en* gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Developmental Biology* **139**, 432–436.
- Martinez, S., Wassef, M. and Alvarado-Mallart, R.-M.** (1991). Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* **6**, 971–981.
- Matsui, T., Hirai, M., Hirano, M. and Kurosawa, Y.** (1993). The HOX complex neighbored by the *EVX* gene, as well as two other homeobox-containing genes, the *GBX*-class and the *EN*-class, are located on the same chromosomes 2 and 7 in humans. *FEBS letters* **336**, 107–10.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S.** (1995). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes & Development* **9**, 2646–2658.

- McMahon, A. P. and Bradley, A.** (1990). The *Wnt-1* (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073–1085.
- McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A. and McMahon, J. A.** (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1*<sup>-/-</sup>/*Wnt-1* mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, 581–595.
- Mercier, P., Simeone, A., Cotelli, F. and Boncinelli, E.** (1995). Expression pattern of two *otx* genes suggests a role in specifying anterior body structures in zebrafish. *The International journal of developmental biology* **39**, 559–73.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R.** (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature genetics* **18**, 136–41.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E. and Joyner, A. L.** (1999). A role for Gbx2 in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161–4.
- Molven, A., Njoistad, P. R. and Fjose, A.** (1991). Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish *wnt-1* (*int-1*) gene. *The EMBO Journal* **10**, 799–807.
- Müller, M., Von Weizsäcker, E. and Campos-Ortega, J. A.** (1996). Transcription of a zebrafish gene of the *hairy-Enhancer of split* family delineates the midbrain anlage in the neural plate. *Development Genes and Evolution* **206**, 153–160.
- Nakamura, H., Nakano, K. E., Igawa, H. H., Takagi, S. and Fujisawa, H.** (1986). Plasticity and rigidity of differentiation of brain vesicles studied in quail-chick chimeras. *Cell differentiation* **19**, 187–93.
- Ninkovic, J., Tallafuss, A., Leucht, C., Topczewski, J., Tannhäuser, B., Solnica-Krezel, L. and Bally-Cuif, L.** (2005). Inhibition of neurogenesis at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary by the combined and dose-dependent activity of a new *hairy/E(spl)* gene pair. *Development* **132**, 75–88.
- Niss, K. and Leutz, A.** (1998). Expression of the homeobox gene *GBX2* during chicken development. *Mechanisms of development* **76**, 151–155.
- Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). *Fgf8* is mutated in zebrafish *acerebellar* (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381–95.
- Rhinn, M. and Brand, M.** (2001). The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Current opinion in neurobiology* **11**, 34–42.
- Rhinn, M., Lun, K., Amores, A., Yan, Y.-L., Postlethwait, J. H. and Brand, M.** (2003). Cloning, expression and relationship of zebrafish *gbx1* and *gbx2* genes to Fgf signaling. *Mechanisms of Development* **120**, 919–936.

- Roeseler, D. A., Sachdev, S., Buckley, D. M., Joshi, T., Wu, D. K., Xu, D., Hannink, M. and Waters, S. T.** (2012). *Elongation factor 1 alpha1* and genes associated with Usher syndromes are downstream targets of GBX2. *PLoS one* **7**, e47366.
- Rubenstein, J. L. R., Shimamura, K., Martinez, S. and Puelles, L.** (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annual review of neuroscience* **21**, 445–477.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1993). *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (1998). The zebrafish organizer. *Current opinion in genetics & development* **8**, 464–71.
- Schulte-Merker, S., Ho, R. K., Herrmann, B. G. and Nüsslein-Volhard, C.** (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* **116**, 1021–32.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J. L.** (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709–18.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. and Boncinelli, E.** (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, 687–90.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., Apice, M. R. D., Nigro, V. and Boncinelli, E.** (1993). homeodomain of the *bicoid* class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. **12**, 2735–2747.
- Smith, S. T. and Jaynes, J. B.** (1996). A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**, 3141–50.
- Song, D. L. and Joyner, A. L.** (2000). Two Pax2/5/8-binding sites in *Engrailed2* are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mechanisms of development* **90**, 155–65.
- Spieler, D., Bäumer, N., Stebler, J., Köprunner, M., Reichman-Fried, M., Teichmann, U., Raz, E., Kessel, M. and Wittler, L.** (2004). Involvement of *Pax6* and *Otx2* in the forebrain-specific regulation of the vertebrate homeobox gene *ANF/Hesx1*. *Developmental biology* **269**, 567–79.
- Stachel, S. E., Grunwald, D. J. and Myers, P. Z.** (1993). Lithium perturbation and *gooseoid* expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* **117**, 1261–74.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degraeve, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X. Q., et al.** (2001). Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. *ZFIN Direct Data Submission*.



**Tour, E., Pillemer, G., Gruenbaum, Y. and Fainsod, A.** (2002). *Gbx2* interacts with *Otx2* and patterns the anterior-posterior axis during gastrulation in *Xenopus*. *Mechanisms of development* **112**, 141–51.

**Urbánek, P., Fetka, I., Meisler, M. and Busslinger, M.** (1997). Cooperation of *Pax2* and *Pax5* in midbrain and cerebellum development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5703–5708.

**Von Bubnoff, a, Schmidt, J. E. and Kimelman, D.** (1996). The *Xenopus laevis* homeobox gene *Xgbx-2* is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm. *Mechanisms of development* **54**, 149–60.

**Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, a L., Rubenstein, J. L., Martinez, S. and Martin, G. R.** (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* **124**, 2923–34.

**Waters, S. T. and Lewandoski, M.** (2006). A threshold requirement for *Gbx2* levels in hindbrain development. *Development* **133**, 1991–2000.

**Webb, K. J., Coolen, M., Gloeckner, C. J., Stigloher, C., Bahn, B., Topp, S., Ueffing, M. and Bally-Cuif, L.** (2011). The Enhancer of split transcription factor Her8a is a novel dimerisation partner for Her3 that controls anterior hindbrain neurogenesis in zebrafish. *BMC developmental biology* **11**, 27.

**Williamson, M. P.** (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *The Biochemical journal* **297**, 249–60.

金井 麻衣子 (2003). ホメオボックス遺伝子 *gbx2* のゼブラフィッシュ胚脳形成における機能の研究. 埼玉大学大学院修士論文

菊田 寛 (2003). 脊椎動物胚発生において中脳後脳境界領域の形成を制御する分子的制御機構の研究. 埼玉大学大学院博士論文

## 図の説明

Figure 1. mRNA 導入による *gbx2* 強制発現の形態的効果

*egfp* (左 1 列) または *gbx2* (右 2 列) の mRNA を 5 pg/胚 (中央列) または 30 pg/胚 (右列) で導入した胚の 26 hpf での形態を示す。(A-C, A'-C') 側方像で左が前方、上が背側。(A''-C'') 背側像で左が前方。右上には代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。*gbx2* mRNA を 30 pg 導入した胚では前脳及び中脳の広範な形成不全胚が多く見られるのに対し、5 pg では峡部異常の割合が高い。矢印は眼胞、黒矢じりは正常な峡部、白抜き矢じりは峡部の形成不全、アステリスクは耳胞を示す。FB, forebrain; MB, midbrain; HB, hindbrain。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 2. mRNA 導入による *gbx2* 強制発現が初期脳領域マーカーの発現に及ぼす効果

*egfp* (左 2 列) または *gbx2* (右 4 列) の mRNA を low dose (5 pg/胚; 中央 2 列) もしくは high dose (30 pg/胚; 右 2 列) で導入した胚について bud 期 (*gbx1* のみ 80% epiboly 期) で固定し、*six3b*、*pax2a*、*egr2b* (A-C, A'-C')、*otx2* (D-G, D'-G')、*wnt1* (H-J, H'-J')、*fgf8a* (K-M, K'-M')、*gbx1* (N-Q, N'-Q') の発現を観察した。(A-Q) 側面像で上が前方、右が背側。(A'-Q') 背側像で上が前方。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。*gbx2* mRNA を 30 pg 導入した胚では *six3b*、*otx2* といった前・中脳で発現する遺伝子や *pax2a*、*wnt1* といった MHB 遺伝子の発現が低下しているのに対し、5 pg の導入では *otx2* を除きほとんどの遺伝子の発現は正常であった。黒矢じりは正常な MHB、白抜き矢じりは MHB での異常な遺伝子発現、アステリスクは異所的な発現を示す。FB, forebrain; MB, midbrain; r3, Rhombomere 3。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 3. mRNA 導入による *gbx2* 強制発現胚において体筋形成終了期で見られる脳領域マーカーの発現

*egfp* (左 2 列) または *gbx2* (右 4 列) の mRNA を low dose (5 pg/胚; 中央 2 列) もしくは high dose (30 pg/胚; 右 2 列) で導入した胚について 24 hpf で固定し、*six3b* (A-C, A'-C')、*otx2* (D-F, D'-F')、*wnt1* (G-I, G'-I')、*pax2a* (J-L, J'-L')、*fgf8* (M-O, M'-O')、*egr2b* (P-R, P'-R') の発現を観察した。(A-R) 側面像で左が前方、上が背側。(A'-R') 背側像で左が前方。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。*gbx2* mRNA を 30 pg 導入した胚では *six3b*、*otx2*、*wnt1*、*pax2a* の発現が低下し、*egr2b* の発現が拡大していた。一方、5 pg 導入胚では *otx2* の発現を除きほとんどの遺伝子の発現は正常であった。矢印は眼胞、黒矢じりは正常な MHB での発現、白抜き矢じりは MHB での異常な遺伝子発現。アステリスクは耳胞を示す。Tel, Telencephalon; Di, Diencephalon; OS, Optic stalk; r3/5, Rhombomere 3/5。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 4. 転写抑制型・活性化型人工 *Gbx2* の構造とその強制発現効果

A. 作製した人工 *gbx2* 遺伝子の名称とコードする産物の構造。ENG-RD, engrailed repressor domain; VP16-AD, VP16 activator domain; HD, homeodomain。B. 野生型 *gbx2* mRNA 導入胚 (c-c", d)、*en-gbx2* mRNA 導入胚 (e-e", f)、*vp-gbx2* mRNA 導入胚 (g-g", h) の bud 期及び 24 hpf での形態。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。*gbx2*、*en-gbx2* の mRNA を導入した胚では前・中脳形成が抑制されるのに対し、*vp-gbx2* mRNA の導入胚では中脳から峡部にかけて形態異常が見られた。また、bud 期では、*en-gbx2* mRNA 導入胚においてのみ、高率で前後軸に沿った伸長が見られた。矢印は眼胞、黒矢じりは正常な峡部、白抜き矢じりは峡部の形態異常、アスタリスクは耳胞を示す。FB, forebrain; MB, midbrain; HB, hindbrain。スケールバーは 200  $\mu$ m。C. *gbx2* 関連遺伝子の強制発現胚における各形態異常の割合。数字は 24 hpf での全胚に占める割合を示す。n は観察した胚総数。

Figure 5. 転写抑制型・活性化型 *gbx2* 遺伝子の強制発現胚における初期脳領域マーカーの発現

*gbx2*、*en-gbx2*、及び *vp-gbx2* の mRNA を導入した胚における bud 期での *otx2* (前・中脳)、*six3b* (前脳)、*pax2a* (MHB)、*egr2b* (第 3/5 菱脳節) の発現を検討した。(A-D, I-L, J", M-P) 側方像で上が前方、左が背側。(A'-D', I'-P', E-H, J"', N", O") 背側像で上が前方。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 6. 転写抑制型・活性化型 *gbx2* 遺伝子の強制発現胚における各種脳領域マーカー発現の定量的解析

*gbx2*、*en-gbx2*、及び *vp-gbx2* mRNA 導入胚における bud 期での *otx2*、*six3b*、*pax2a*、*egr2b* 発現量を Q-PCR 法を用いて解析した。各値は 18S RNA の発現量により内部補正した上、*egfp* mRNA 導入胚における発現に対する相対値として示した。\*,  $p < 0.5$ ; \*\*\*,  $p < 0.05$ 。エラーバーは SE。前・中脳マーカーである *otx2* 及び *six3b* の発現量は、*gbx2*、*en-gbx2* の導入胚において顕著に低下しているのに対し、*vp-gbx2* 導入胚では増大していた。*egr2b* の発現は逆に *gbx2*、*en-gbx2* 導入胚で増大する一方、*vp-gbx2* 導入胚で低下した。

Figure 7. 転写抑制型・活性化型 *gbx2* 遺伝子発現胚における背腹パターンニングの検討  
*egfp*、*gbx2*、*en-gbx2*、及び *vp-gbx2* の mRNA を導入した胚を 60% epiboly 期で固定し、*eve1* (A-D, A'-D') と *chd* (E-H, E'-H') の発現を観察した。(A-H) 側面像で上が前方、右が背側。(A'-H') 動物極像で右が背側。右上は代表的な表現型、右下はその表現型の胚の占める割合と胚総数、矢じりは各遺伝子の発現境界を示す。*gbx2* または *en-gbx2* の mRNA を導入した胚では、*eve1* の発現領域が縮小し、*chd* の発現が

腹側に拡大したのに対し、*vp-gbx2* mRNA 導入胚では、*eve1* が背側に拡大すると同時に *chd* の発現領域が縮小した。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

#### Figure 8. S4.2 領域への Gbx2 タンパク質の結合能の検討

A. S4.2 の配列検索から予想された Gbx 結合配列の位置と EMSA で Gbx2 結合能を検討した DNA 領域。PBS, Pax-binding site; 黒楕円、TATTAA; 灰色楕円、ATTAA; 白楕円、ATTA。スケールバーは 100 bp。B. Gbx2 タンパク質と DIG 標識した mouse *Lmo3* 転写制御領域内 Gbx2 結合配列オリゴ (*Lmo3-ab*, *ab*) との *in vitro* での結合に対する S4.2 内部 DNA 領域 (Gx1、Gx2、Gx3、Gx3mt) 及び *Foxg1* 結合配列 (BF1) の 300 倍過剰での競合活性を、EMSA により検討した。対照として、同じ DIG 標識プローブと *Foxg1* との結合活性も示す。*ab* オリゴと Gbx2 の特異的結合は Gx3 により競合を受けるが、この競合活性は Gx3 内の TATTAA に変異が入ることで大きく低下する。矢印は Gbx2 の特異的な結合により生じたバンドの位置、アスタリスクはフリープローブを示す。

#### Figure 9. S4.2 エンハンサーの *gbx2* による制御に関する *in vitro* 解析 (*INF- $\beta$* promoter-P19 細胞系)

A. レポーター遺伝子 pS4.2-Luc の構造。pGL2 がベースであり、*INF- $\beta$*  promoter が用いられている。矢印は転写開始点を示す。B. P19C6 細胞に *gbx2*、*en-gbx2*、及び *vp-gbx2* 発現プラスミドをエフェクターとして共導入した際の pS4.2-Luc レポーター活性。*gbx2* 及び *en-gbx2* は導入量依存的にレポーター活性を抑えるのに対し、*vp-gbx2* は逆に活性化させた。C. *gbx2* を *fgf8a*、*pax2a* と共に P19C6 細胞に共導入したときの pS4.2-Luc レポーター活性。このレポーター活性は *pax2a* と共導入すると上昇し、*fgf8a* と *pax2a* の共導入で相乗的に上昇するが、*gbx2* の共導入により強く抑制された。D. *en-gbx2* または *vp-gbx2* を *fgf8a*、*pax2a* とともに P19C6 細胞に共導入したときの pS4.2-Luc レポーター活性。縦軸は、エフェクターがない状態でのレポーター発現に対する相対値を示す。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ 。エラーバーは SE。

#### Figure 10. S4.2 エンハンサーの *gbx2* による制御に関する *in vitro* 解析 (*fgf8a* promoter-P19 細胞系)

A. レポーター遺伝子 pf8pro-Luc2 及び pS4.2-Luc2 の構造。*fgf8a* promoter を用いている。*fgf8a* promoter (f85'UTR) のみを *Luc2* 遺伝子につないだ pf8pro-Luc2 と、S4.2 及び *fgf8a* promoter をつないだ pS4.2-Luc2 を、pGL4 をベースとして作製した。pA, polyA 配列。B. レポーター遺伝子のみを P19C6 細胞へ導入したときの luciferase 活性を、pGL4 のみ導入した際の luciferase 活性に対する相対値として示した。S4.2 によりレポーター活性が大きく上昇している。C. pf8pro-Luc2 と各エフェクター遺伝子を P19C6 細胞へ共導入させたときの luciferase 活性をエフェクター非存在下での活性に対する相対値として示した。promoter 領域はエフェクター

遺伝子の応答能をほとんど持たない。エラーバーは SE。

Figure 11. S4.2-Luc2 活性に対する *gbx2* 及び脳形成遺伝子の効果 (*fgf8a* promoter-P19 細胞系)

A. 様々な量の *gbx2* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 と共に P19C6 細胞へ導入した際の luciferase 活性。*gbx2* は導入量依存的にレポーター活性を抑制した。B. *gbx2*、*en-gbx2*、または *vp-gbx2* を pS4.2-Luc2 とともに P19C6 細胞へ共導入した際の luciferase 活性。*en-gbx2* は *gbx2* 同様、導入量依存的にレポーター活性を抑制したのに対し、*vp-gbx2* は活性化させた。C. 様々な量の *fgf8a* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 とともに P19C6 細胞へ共導入した際の luciferase 活性。pS4.2-Luc2 とは異なり、*fgf8a* に対する応答能は見られなかった。D. 様々な量の *pax2a* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 とともに P19C6 細胞へ共導入した際の luciferase 活性。60 ng 以下の導入では一様にレポーター活性を上昇させた。全て、エフェクター非存在下での luciferase 発現に対する相対値で示した。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ 。エラーバーは SE。

Figure 12. pS4.2-Luc2 活性に対する *gbx2*、*en-gbx2*、*vp-gbx2* 及び各種脳形成遺伝子の効果(*fgf8a* promoter-HEK293T 細胞系)

A. 様々な量の *gbx2* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞へ共導入した際の luciferase 活性。60 ng 以下の導入では、量に依存してレポーター活性を抑制した。300 ng では一転して抑制効果が失われた。B. *gbx2*、*en-gbx2*、または *vp-gbx2* を pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞に共導入した際の luciferase 活性。*gbx2* 及び *en-gbx2* は、低導入量のときに量依存的に抑制した。*vp-gbx2* もレポーター活性を抑制したが、量依存的に抑制効果が減退した。C. 様々な量の *fgf8a* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞に共導入した際の luciferase 活性。高導入量になるにつれてレポーター活性を低下させた。D. 様々な量の *pax2a* 発現プラスミドを pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞に共導入した際の luciferase 活性。量依存的にレポーター活性を上昇させた。E. *pax2a* と *gbx2* を pS4.2-Luc2 とともに HEK293T 細胞に共導入した際の luciferase 活性。*pax2a* により活性化されたレポーター活性は、*gbx2* の共導入により強く抑制された。全て、エフェクター非存在下での luciferase 発現に対する相対値で示した。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ 。エラーバーは SE。

Figure 13. 胚での強制発現実験に用いた部分欠失 Gbx2 コンストラクトシリーズ作製した分子内欠失 *gbx2* 遺伝子の名称と遺伝子産物の構造を示す。各遺伝子は、N 末側に FLAG tag が付加されている。Eh1, Eh1 様配列; IVR, Intervening region; Pro-rich, 高 Pro 配列; NCR, N-terminal core region; FT, FLAG tag。

**Figure 14. Gbx2 と Flag-tag 付加 Gbx2 の胚に対する強制発現効果の比較**  
異なる量の *gbx2* mRNA または *ft-gbx2* mRNA を胚に導入し、24 hpf で形態観察をした。n は観察した胚総数。各バーの上に測定値を示す。いずれの遺伝子についても、導入する mRNA 量を増やすにつれて峡部欠損の割合が減り、前・中脳異常の割合が増えている。

**Figure 15. N 末領域または C 末領域を欠失した Gbx2 の強制発現効果**  
N 末領域または C 末領域を欠失させた *gbx2* の mRNA を胚に導入し (50 pg/胚)、bud 期 (10 hpf; A, D, G, J, M, P) または 26 hpf (C, F, I, L, O, R) において脳領域マーカー遺伝子 (*six3b*, *pax2a*, *egr2b*) の発現を検討すると共に、26 hpf で胚の頭部形態 (B, E, H, K, N, Q) を観察した。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。野生型 *gbx2* を強制発現すると、bud 期において前脳での *six3b* の発現が低下したが、*gbx2-ΔN* ( $\Delta N$ )、*gbx2-ΔC* ( $\Delta C$ ) ではこの効果が弱くなった。*gbx2-HD* (*HD*)、*gbx2-ND* (*ND*) 発現胚ではほとんど異常は見られなかった。26 hpf でも基本的に bud 期の結果と一致し、*gbx2-ΔN/-ΔC* 発現胚における前・中脳抑制胚の割合は野生型 *gbx2* に比べて低下した。矢印は眼胞、黒矢じりは正常に形成された MHB 又は峡部、白矢じりは MHB 又は峡部の形成異常、アスタリスクは耳胞を示す。FB, Forebrain; MB, Midbrain; HB, Hindbrain; r3/5, rhombomere 3/5。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

**Figure 16. Gbx2 タンパク質の内部構造とアミノ酸配列の脊椎動物種間比較**  
ゼブラフィッシュ、ヒト、マウス、及び *Xenopus* の *Gbx2* タンパク質についてアミノ酸配列を比較した。種間保存領域 (CD) を茶色の下線で示す。CD1 内には Eh1 様配列 (赤色)、IVR 配列 (橙色)、高 Pro 配列 (水色) が存在する。ホメオドメイン (草色) は CD3 に相当する。アスタリスクはすべての種で同一のアミノ酸、コロン及びドットは保存的置換及び半保存的置換の見られるアミノ酸、ハイフンは対応を最大限とするために導入したギャップを示す。

**Figure 17. N 末領域内部分配列を欠失した Gbx2 の強制発現胚における脳領域化**  
Eh1 様配列、高 Pro 配列、IVR 配列に着目して欠失を導入した *gbx2* 遺伝子の mRNA を導入した胚において (50 pg/胚)、bud 期 (A, D, G, J, M, P, S) 及び 28 hpf (B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q, R, T, U) における脳領域マーカーの発現と頭部形態を検討した。右下の数値は、*six3b* と *pax2a* の発現が同時に低下した胚、または前・中脳形成不全胚 (*gbx2-ΔIVR*、*gbx2-ΔNCR* 胚では中脳・峡部異常胚) の割合と観察した全胚数を示す。*gbx2-ΔEh1* ( $\Delta Eh1$ )、*gbx2-ΔEP* ( $\Delta EP$ ) では *gbx2* の前・中脳抑制活性が低下した。*gbx2-ΔIVR* ( $\Delta IVR$ )、*gbx2-ΔNCR* ( $\Delta NCR$ ) では前・中脳抑制活性が低下すると同時に、中脳領域の変形と峡部欠損が見られた。矢印は眼胞、黒矢じりは正常な MHB 又は峡部、白抜き矢じりは MHB 又は峡部の形成異常、傍線は中脳様構造、アスタリスクは耳胞を示す。FB, Forebrain; MB, Midbrain; HB, Hindbrain;

r3/5, rhombomere 3/5。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

**Figure 18. 各種 Gbx2 関連遺伝子の強制発現で見られる背側化効果**

各種 Gbx2 関連遺伝子 (*gbx2*、*gbx2- $\Delta$ Pro*、*en-gbx2*、*gbx1*) の mRNA 導入による強制発現胚において、bud 期で見られる動植物軸に沿った伸長と脳領域マーカーの発現を調べた。A. 右下の数値は伸長胚 (b-d)、脳領域マーカー発現が前方へシフトした胚 (f-i)、または腹側へ拡大した胚 (g'-i') の割合と胚総数。野生型 *gbx2* を強制発現しても胚の動植物極軸方向の伸長はほとんど見られない。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。B. *gbx2* 関連遺伝子の mRNA 導入により動植物軸に沿って伸長した胚の割合。*gbx2- $\Delta$ Pro* 以外の欠失型コンストラクトを強制発現しても伸長は見られない。n は観察した遺伝子導入胚の総数。

**Figure 19. N 末領域内非保存配列を欠失した gbx2 の強制発現胚における頭部形態**

N 末端配列 (Nt) あるいはリンカー配列 (Lin1、Lin2) を欠失した *gbx2* 遺伝子 (*gbx2- $\Delta$ Nt*、*gbx2- $\Delta$ Lin1*、*gbx2- $\Delta$ Lin2*) の mRNA を導入して強制発現を行った胚における 28 hpf での頭部形態を示す。右上は代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。NCR 以外の CTR 内領域を欠失させても、*gbx2* の前・中脳抑制活性はほとんど変化しない。矢印は眼胞、黒矢じりは正常な峡部、白抜き矢じりは峡部形成の不全、アステリスクは耳胞を示す。FB, Forebrain; MB, Midbrain; HB, Hindbrain; r3/5, rhombomere 3/5。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

**Figure 20. NCR 領域欠失 gbx2 の強制発現胚と ace 胚で見られる表現型の比較**

A. *ace* 胚及び *gbx2- $\Delta$ NCR* mRNA 導入胚の 28 hpf で見られる脳の形態と脳領域マーカー (*six3b*, 前脳; *pax2a*, MHB; *egr2b*, 第 3/5 菱脳節) の発現。矢じりは峡部又は MHB。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。B. *gbx2- $\Delta$ NCR* 発現胚と *ace* 胚における耳胞の形態。28 hpf 胚では耳胞の発生が進行し、耳石が明瞭になる。*ace* 胚では耳胞が小さく、耳石も明瞭には見られない。一方、*gbx2- $\Delta$ NCR* 強制発現胚の耳胞はコントロールと形態的に違いが見られない。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。C. *gbx2- $\Delta$ NCR* 強制発現胚と *ace* 胚の耳胞の大きさの定量的比較。長軸方向と短軸方向の径の平均値 (上段) 及び短軸 : 長軸の比 (下段) を示す。mRNA 導入量はすべて 50 pg/胚。野生型 *gbx2* を強制発現しても、耳胞の大きさに影響は見られなかった。部分欠失 *gbx2* の強制発現胚の耳胞の直径も、コントロールと比べて有意差はなかった。一方で *ace (-/-)* 胚の耳胞は、長径、短径ともに短縮しており、有意差が認められた。なお、短径と長径の比率については、強制発現胚、*ace* 胚ともにコントロールとの有意差は見られなかった。\*\*\*,  $p < 0.005$ 。エラーバーは SD。

**Figure 21. NCR 欠失 gbx2 の強制発現が初期胚での脳原基領域化に及ぼす効果**

*gbx2- $\Delta$ NCR* mRNA を導入 (50 pg/胚) した胚での bud 期 (*gbx1* のみ 80% epiboly 期) における *six3b*、*pax2a*、*egr2b* (A, A', B, B'), *otx2* (C, C', D, D'), *fgf8a* (E, E', F, F')

F')、*wnt1* (G, G', H, H')、*gbx1* (I, I', J, J') の発現を検討した。右上に写真で示された代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。黒矢じりは MHB を示す。FB, Forebrain; MB, Midbrain; r3, rhombomere 3; r5, rhombomere 5。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 22. NCR 欠失 *gbx2* の強制発現が 26 hpf での前・中脳領域化に及ぼす影響 *egfp* mRNA 導入対照胚 (50 pg/胚; 左列)、*gbx2- $\Delta$ NCR* mRNA (50 pg/胚) の導入で生じた中脳・峡部異常胚 (中央列)、そして high-dose の *ft-gbx2* mRNA 導入 (50 pg/胚) で生じた前・中脳形成不全胚 (右列) について、26 hpf における *emx3* (A-C)、*dlx2a* (D-F)、*six3b* (G-I, G'-I')、*otx2* (J-L, J'-L') の発現を検討した。右上に写真で示された代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。(A-L) 側方像で左が前方、上が背側。(G'-I') 前方像で上が背側。(J'-L') 背側像で左が前方。矢印は眼胞を示す。Tel, telencephalon; Di, diencephalon; Tec, tectum。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 23. NCR 欠失 *gbx2* の強制発現が峡部形成に及ぼす効果 *egfp* mRNA 導入対照胚 (50 pg/胚; 左列)、*gbx2- $\Delta$ NCR* mRNA (50 pg/胚) の導入で生じた中脳・峡部異常胚 (中央列)、そして high-dose の *ft-gbx2* mRNA 導入 (50 pg/胚) で生じた前・中脳形成不全胚 (右列) について、28 hpf における *wnt1* (A, A', B, B')、*eng2a* (C-E, C'-E')、*pax2a* (F, F', G, G')、*efna5a* (H-J, H'-J')、*fgf8a* (K, K', L, L') の発現を検討した。右上に写真で示された代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。黒矢じりは MHB、白矢じりは MHB での異常な遺伝子発現を示す。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 24. NCR 欠失 *gbx2* の強制発現が中脳から後脳にかけての脳形成に及ぼす効果 *egfp* mRNA 導入対照胚 (50 pg/胚; 左列)、*gbx2- $\Delta$ NCR* mRNA (50 pg/胚) の導入で生じた中脳・峡部異常胚 (中央列)、そして high-dose の *ft-gbx2* mRNA 導入 (50 pg/胚) で生じた前・中脳形成不全胚 (右列) について、28 hpf における *elavl3* (A-C, A'-C') と *atoh1a* (D-F, D'-F') の発現、22 体節期における *grhl2b* (G-I, G'-I') の発現、24 hpf における *egr2b* (J, J', K, K') の発現、3 dpf における *pvalb7* (L-N) の発現を検討した。右上に写真で示す代表的な表現型、右下にその表現型を示す胚の占める割合と胚総数を示す。黒矢じりは MHB、白矢じりは MHB での異常な遺伝子発現、矢印は前方側線原基、アステリスクは耳胞、丸印は異所的な遺伝子発現を示す。Tel, telencephalon; r3/5, rhombomere 3/5。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 25. 各部分欠失 *gbx2* 遺伝子の産物についてのウェスタンブロット解析 部分欠失型 *gbx2* 人工遺伝子の発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、可溶化タンパク質を 10-20%グラジエント SDS-Polyacrylamide gel で分離後、PVDF 膜に転写し、抗 FLAG 抗体を用いて染色した。左端はサイズマーカー。



Figure 26. *hsp-gbx2* 遺伝子の構造と加温処理実験の概要

A. *hsp-gbx2* 遺伝子の構造。 *hsp70l* promoter は加温処理により下流遺伝子の転写を活性化させる。なお、ここで用いた *gbx2* の 5' 末には FLAG tag が付加されている。FT, FLAG tag。 B. Tg:*hsp-gbx2* 魚を用いた加温処理実験の手順。野生型魚と交配して得られた胚を用い、適切な発生時期で加温処理を行った後、形態観察又はマーカー遺伝子の発現解析を行った。

Figure 27. *hsp-gbx2* コンストラクト DNA 導入胚における加温処理の効果

A. 1 細胞期の胚に PCR で増幅した *hsp-gnx2* DNA を微小注入し (10 pg/胚)、50% epiboly 期に加温処理を行った *hsp-gbx2* 導入胚における *gbx2* mRNA の発現を WMISH で検討した。右下に *gbx2* の異所的発現があった胚の割合と胚総数を示す。(a-d) 多数の染色胚をまとめて示した。(a'-d') 背面像で上が前方。 B. 加温処理時間と *gbx2* 発現誘導の関係。(a-g, a'-g') Bud 期において、*hsp-gbx2* 導入胚 (10 pg/胚) を 37°C で異なる時間加温処理し、直後に固定して *gbx2* mRNA の発現を WMISH で検討した。右下の数値は 1 胚あたり半分以上の細胞が *gbx2* を異所的に発現した胚の割合と胚総数を示す。(a-g) 多数の染色胚をまとめて示した。(a'-g') 背面図で上が前方。(h) グラフは異所的 *gbx2* 発現胚の割合を示す。+, 胚あたり半分以下の細胞で異所的発現が見られた胚; ++, 半分以上の細胞で異所的発現が見られた胚。縦軸は全体に占める割合 (%)。上に胚総数を示す。 C. 加温処理した *hsp-gbx2* 導入胚 (10 pg/胚) の 28 hpf における頭部形態 (a, b) と共導入した CMV-egfp に依存した蛍光 (c) を示す。右上は写真に示す代表的な表現型、右下はその表現型を示す胚の占める割合 (a, b)、または蛍光の見られた胚の割合 (c) と胚総数を示す。矢じりは峡部、アステリスクは耳胞を示す。(a, b) 側面像で左が前方、上が背側。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 28. Tg:*hsp-gbx2* 胚における *gbx2* の加温誘導

A. 異なる発生段階で加温処理を行った Tg:*hsp-gbx2* 胚における *gbx2* 発現の誘導。Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を shield 期 (a-d)、bud 期 (e-h)、18 体節期 (i, i', j, j') において 35°C で 15 分間 (a, b, e, f) または 37°C で 30 分間 (c, d, g, h, i, i', j, j') 加温処理を行い、直後に固定した上で *gbx2* の発現を WMISH で検討した。右下の数値は各表現型が占める割合と胚総数。(a-j) 背側像で上が前方。(i', j') 側面像で左が前方、上が背側。スケールバーは 200  $\mu$ m。 B. Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚、または野生型胚を shield 期、bud 期、18 体節期にそれぞれ加温処理 (37°C, 30 分間) をした上で直後に回収し、*gbx2* の発現を全長プローブ及び *gbx2* 3'-UTR プローブで Q-PCR 法により検討した。縦軸 (及びバーの上の数値) は、18S RNA の発現量により内部補正した mRNA 量について、bud 期野生型胚における発現量との相対値を示す。wt, 野生型処理胚; *hsp-gbx2*, Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚集団。エラーバーは SE。

**Figure 29.** 加温処理後の *Tg:hsp-gbx2* 胚における *gbx2* 発現の急激な減少

**A.** 加温処理後の *Tg:hsp-gbx2* 胚における *gbx2* mRNA の減少。 *Tg:hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型との交配で得られた胚、または野生型胚を bud 期で加温処理 (37°C, 30 分間) し、0, 1, 2 hours post-heat shock (hph) で固定して *gbx2* mRNA の発現を WMISH により検討した。右下は各表現型の占める割合と胚総数。矢じりは MHB を示す。(a-f) 背面像で上が前方。(a'-f') 側面像で上が前方、右が背側。スケールバーは 200 μm。

**B.** 加温処理をした胚における *gbx2* 及び *gbx2* 3'-UTR 発現量の Q-PCR による定量的解析。Bud 期に加温処理 (37°C, 30 分間) をした *Tg:hsp-gbx2* 胚を 0, 1, 2, 3, 4 hph でそれぞれ回収し、Q-PCR 法により *gbx2* mRNA の発現を検討した。縦軸 (及びバーの上の数値) は 18S RNA の発現量により内部補正した mRNA 量について、野生型胚における発現量との相対値を示す。wt, 野生型処理胚; *hsp-gbx2*, *Tg:hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型との交配で得られた胚集団。エラーバーは SE。

**Figure 30.** 加温処理した *Tg:hsp-gbx2* 胚の形態

**A.** 加温処理した *Tg:hsp-gbx2* 胚の prim-5 期における代表的な表現型。主に、峡部の形成が不完全なもの (isthmus defect: mild)、完全に欠損するもの (isthmus defect: severe)、峡部形成が正常なもの (normal) の 3 種類に区別できる。黒矢じりは正常に形成された峡部、白矢じりは不完全ないし欠損した峡部領域、矢印は眼胞、アスタリスクは耳胞を示す。FB, forebrain; MB, midbrain; HB, hindbrain。(a-c) 側方像で左が前方、上が背側。(a'-c') 背面像で左が前方。スケールバーは 200 μm。

**B.** 各発生段階での加温処理により prim-5 期で観察された表現型の割合。 *Tg:hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型との交配で得られた胚を異なる発生段階で加温処理 (35°C, 15 分間) し、prim-5 期で観察した。バーの上部に観察した胚総数を示す。

**Figure 31.** 異なる発生時期で加温処理した *Tg:hsp-gbx2* 胚の prim-5 期における脳領域マーカーの発現

*Tg:hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型との交配で得られた胚を shield 期 (C-F)、80% epiboly 期 (G-J)、bud 期 (K-N)、6 体節期 (O-R)、10 体節期 (S-U)、18 体節期 (V, W)、21 体節期 (X, Y) で加温処理 (37°C, 30 分間) し、prim-5 期まで培養して *six3b* (前脳)、*pax2a* (MHB)、*egr2b* (後脳) 又は *shh* (ZLI 及び底板)、*fgf8a* (MHB) の発現を WMISH で検討した。(左から 1 列目と 3 列目) 発現の正常な胚。(左から 2 列目と 4 列目) 発現が低下した胚。右上に胚総数、右下に各表現型の全体に占める割合とそのうちの *Tg* 胚の割合 (C-F, K-N) を示す。矢じりは MHB、白矢じりは発現の低下が見られた胚領域。全て側方像で左が前方、上が背側。スケールバーは 200 μm。

**Figure 32.** 加温処理した *Tg:hsp-gbx2* 胚における prim-5 期での脳形成遺伝子の発現

*Tg:hsp-gbx2*<sup>+/+</sup> と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (37°C, 30 分間)、Prim-5 期まで培養した後、*otx2* (前・中脳; A, A', B, B'), *wnt1* (中脳視蓋及び

MHB ; C, C', D, D'), *her5* (MHB; E-G, E'-G') の発現を WMISH で検討した。右上に胚総数、右下に各表現型を示す胚が全体に占める割合とそのうちの Tg 胚の割合 (A, B) を示す。矢じりは MHB、白丸は異所的な発現。(A-G) 側方像で左が前方、上が背側。(A'-G') 背面像で左が前方。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 33. 異なる発生時期で加温処理した Tg:*hsp-gbx2* 胚における *otx2* mRNA の発現

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を shield 期 (A, A', B, B'), 80% epiboly 期 (C, C', D, D'), bud 期 (E, E', F, F'), 6 体節期 (G, G', H, H'), 14 体節期 (I, I', J, J'), 18 体節期 (K, K', L, L') で加温処理 (35°C, 15 分間) し、2 hph で *otx2* の発現を WMISH により検討した。染色後、一部の胚については genotyping を行った (M)。(左 2 列) 発現が正常な胚。(右 2 列) 発現が低下した胚。(A-L) 側面像で上が前方、右が背側。(A'-L') 背面像で上が前方。右上に胚総数、右下に各表現型の全体に占める割合とそのうちの Tg 胚の割合 (A, B, E-H) を示す。スケールバーは 200  $\mu$ m。(M) 上に示された時期に加温誘導し、2 hph で固定した胚について、*otx2* 発現が正常な胚 (+)、発現低下胚 (-) 各々について、*hsp-gbx2* 配列の有無を検討した。左端は Tg 魚作製に用いた pTol2-*hsp-gbx2* プラスミド DNA を鋳型にした PCR 産物。矢印は PCR によって増幅された *hsp-gbx2* の配列。

Figure 34. 加温処理した Tg:*hsp-gbx2* 胚における初期脳形成遺伝子の発現の変化  
Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (37°C, 30 分間)、0, 1, 2 hph で *otx2* (前・中脳; A, A', C, C', F, F'), *wnt1* (B, D, D', G, G'), *pax6* (前・中脳; E, E', H, H'), *six3b* (前脳; I, L, N, N'), *pax2a* (MHB; J, L, O, O'), *fgf8a* (MHB; K, M, P) の発現を WMISH で検討した。(A-P) 発現が正常である胚。(A', C'-H', N', O') 発現が低下した胚。右上に胚総数、右下に各表現型を示す胚の占める割合とそのうちの Tg 胚の割合 (A, A', C-H, C'-H', N, N', O, O') を示す。矢じりは MHB を示す。FB, forebrain。全て背面像で上が前方。スケールバーは 200  $\mu$ m。

Figure 35. WMISH での結果に基づき区分した Tg:*hsp-gbx2* 胚の genotyping の泳動図  
Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (37°C, 30 分間)、0, 1, 2 hph で *otx2*, *wnt1*, *pax6*, *six3b*, *pax2a* の発現を WMISH で検討したのち、発現が正常な胚 (normal)、発現低下胚 (reduced) 各々について、*hsp-gbx2* 配列の有無を検討した。発現正常胚はほぼ野生型であり、発現低下胚はほぼ全て Tg 胚である。H, *hsp-gbx2* の PCR による増幅産物; G, ゲノム配列の PCR による増幅産物 (positive control)。

Figure 36. *gbx2* の強制発現により発現が変動する遺伝子についてのマイクロアレイ解析

A. マイクロアレイでの発現比較解析のためのサンプル作製の手順。Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>

と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し、0 hph または 2 hph で個別に回収した。胚ごとの genotyping の結果に基づいて Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>胚 RNA と野生型胚 RNA を各々プールした。これらの RNA について Affymetrix 社のチップを用いて遺伝子発現の比較解析を行った。B. 実際に行った genotyping の結果の例。上に胚個体番号を示す。各々左レーンがゲノム配列 (*fe37b04*)、右レーンが *hsp-gbx2* 配列の PCR による増幅結果を示す。写真上部の○印は目的の増幅産物が確認されたレーン、×印は目的の産物が確認されなかったレーンを示す。中央はサイズマーカーで、桃色の線のうち上が 500 bp、下が 200 bp。

Figure 37. マイクロアレイ解析によって見出された *gbx2* の下流候補脳形成関連遺伝子

*hsp-gbx2* を bud 期において誘導し、直後 (0 hph) または 2 時間後 (2 hph) に RNA を胚より抽出して、Tg 胚と野生型胚の間での発現比較をマイクロアレイにより行った。その結果見出された発現変動の顕著な遺伝子と特に脳形成に関与する遺伝子について、遺伝子数、名称、発現変動率を示す。発現が低下した遺伝子の数は 0 hph で 126、2 hph で 235、どちらにも含まれる遺伝子は 18 であった。一方、発現が上昇した遺伝子の数は 0 hph で 141、2 hph で 85、どちらにも含まれるものは 5 であった。なお、一部は WMISH または Q-PCR で発現変動を確認した (Confirmed)。N.D., no difference.

Figure 38. マイクロアレイで変動が見出された遺伝子群の *gbx2* 誘導胚における発現 (I)

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (35°C, 15 分間)、0, 1, 2 hph で *hoxa3a*, *lhx8a*, *snai2* (A, F-H, M; 以上マイクロアレイ解析で発現上昇とされた遺伝子/Activated-MA)、*acp5a*, *foxi1*, *mxtx1*, *neurog1*, *sepp1a*, *zic3*, *otx1b*, *otx2* (B-E, I-L, N, O-W, Q', U', V', W'; 以上マイクロアレイ解析で発現低下とされた遺伝子/Repressed-MA) の発現を WMISH で検討した。右に胚総数、各表現型を示す胚が占める割合、そのうちの Tg 胚の割合 (U, U', W, W') を示す。矢じりは MHB。全て背面像で上が前方。スケールバーは 200 μm。 *otx1b*, *otx2* でのみ発現低下が観察されており (Q, Q', U, U', V, V', W, W') 他の遺伝子では発現変動は見られなかった。

Figure 39. マイクロアレイで変動が見出された遺伝子群の *gbx2* 誘導胚における発現 (II)

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>と野生型との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (37°C, 30 分間)、2 hph で *hoxa3a*, *snai2* (A, B; マイクロアレイ解析で発現上昇とされた遺伝子/Activated-MA)、*acp5a*, *foxi1*, *mxtx1*, *neurog1*, *sepp1a*, *zic3*, *her5*, *hesx1*, *klf2a*, *otx1b* (C-O, H', L'; 以上マイクロアレイ解析で発現低下とされた遺伝子/Repressed-MA) の発現を WMISH で検討した。右上に胚総数、右下に各表現型の全

体に占める割合とそのうちの Tg 胚の割合 (H-O) を示す。矢じりは MHB。全て背面像で上が前方。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。この加温処理では、*otx1b* に加えて *her5*、*hesx1*、*klf2a* で発現低下が見られた。なお *her5* は体節での発現は正常であり (H', L'), MHB でのみ低下した (H, L)。

Figure 40. 加温処理後の Tg:*hsp-gbx2* 胚における *otx1b*、*hesx1*、*her5* 発現低下についての経時的解析

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>魚と野生型魚との交配で得られた胚を bud 期で加温処理後 (37°C, 30 分間)、0, 1, 2 hph で *hesx1*、*her5* の発現を WMISH で検討した。各遺伝子で左列は発現正常胚、右列は発現低下胚を示す。(A-K) 側面像で上が前方、右が背側。(A'-K') 背面像で上が前方。右上に胚総数、右下に各表現型を示す胚が占める割合とそのうちの Tg 胚の割合を示す (A, B, D-K)。矢じりは MHB。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

Figure 41. 加温処理後の Tg:*hsp-gbx2* 胚における発現変動候補遺伝子の実際の発現変化についての定量的解析

Tg:*hsp-gbx2*<sup>+/+</sup>魚と野生型魚との交配で得られた胚を bud 期で加温処理し (37°C, 30 分間)、0, 1, 2, 3 hph で個別に回収した後 genotyping に基づき RNA サンプルを Tg 胚と野生型胚ごとに調製し、Q-PCR 法で表示遺伝子の mRNA の発現を定量的に解析した。(上段) マイクロアレイで発現上昇とされた遺伝子、(下段) マイクロアレイで発現低下とされた遺伝子。橙色は野生型シブリングと比較して有意に発現が上昇していたもの、水色は野生型シブリングと比較して有意に発現が低下していたものを示す。マイクロアレイ解析で見られた発現の増減と基本的に一致していた。\*,  $p > 0.05$ , \*\*,  $p > 0.01$ 。エラーバーは SD。

Figure 42. ゼブラフィッシュ Gbx1、Gbx2 のアミノ酸配列比較

ゼブラフィッシュが有する 2 つの Gbx タンパク質、Gbx1 及び Gbx2 のアミノ酸配列を比較している。両者はホメオドメインの他、CTR と NTR 内の Eh1、IVR 配列において相同性を示すが、Gbx1 では高 Pro 配列は見られない。Eh1 様配列を赤色、IVR 配列を橙色、高 Pro 配列を水色、ホメオドメインを草色で示す。CD1-4 は各種脊椎動物 Gbx2 間での保存配列であり、詳細は Fig. 16 に示す。

**Table 1. WMISH に用いた RNA プローブ**

遺伝子	クローン名	直鎖化に用いた制限酵素	RNA polymerase	由来
<i>acp5a</i>	cb576	<i>NotI</i>	T7	ZIRC
<i>atoh1a</i>	pBS+zath1	<i>EcoRI</i>	T3	名古屋大学、日比正彦博士より供与
<i>dlx2a</i>	dlx2a	<i>BamHI</i>	T7	名古屋大学、日比正彦博士より供与
<i>efna5a</i>	pBK-CMV-efna5a	<i>EcoRI</i>	T7	ZIRC
<i>egr2b</i>	krox20	<i>PstI</i>	T3	東京大学、武田洋幸博士より供与
<i>elavl3</i>	pSP65HuC	<i>HindIII</i>	SP6	名古屋大学、日比正彦博士より供与
<i>emx1</i>	emx3	<i>BamHI</i>	T3	
<i>fgf8</i>	pBS-fgf8	<i>NotI</i>	T7	東京大学、武田洋幸博士より供与
<i>foxi1</i>	cb724	<i>NotI</i>	T7	ZIRC
<i>gbx1</i>	gbx1-pSPORT1	<i>Sall</i>	SP6	ZIRC
<i>gbx2</i>	gbx2-pBSII	<i>SpeI</i>	T7	所属研究室で単離
<i>her5</i>	her5(SK-)	<i>XhoI</i>	T3	José Campos-Ortega 博士より供与
<i>hesx1</i>	pCS2+hesx1#1	<i>EcoRI</i>	T7	当研究で単離
<i>hoxa3a</i>	cb332	(PCR)	T3	ZIRC
<i>klf2a</i>	pCS2+klf2a	<i>BamHI</i>	T7	当研究で単離
<i>lhx8a</i>	cb875	<i>BamHI</i>	T7	ZIRC
<i>mxtx1</i>	cb779	<i>NotI</i>	T7	ZIRC
<i>neurog1</i>	zNG1	<i>EcoRI</i>	T7	名古屋大学、日比正彦博士より供与
<i>otx1b</i>	cb769	<i>NotI</i>	T7	ZIRC
<i>otx2</i>	pM2	<i>Sall</i>	T7	立命館大学、三品昌美博士より供与
<i>pax2a</i>	pax2a	<i>EcoRI</i>	T3	ZIRC
<i>pax6a</i>	pax6.1	<i>BamHI</i>	T7	Terje Johansen 博士より供与
<i>pvalb7</i>	pBS-SK+pvalb7	<i>BamHI</i>	T7	名古屋大学、日比正彦博士より供与
<i>sepp1a</i>	cb688	<i>BamHI</i>	T3	ZIRC
<i>shh</i>	phh(c)8.3	<i>HindIII</i>	T7	Philip Ingham 博士より供与
<i>six3b</i>	six3b	<i>BamHI</i>	T3	筑波大学、小林麻己人博士より供与
<i>snai2</i>	cb147	<i>NotI</i>	T7	ZIRC
<i>wnt1</i>	ZFwnt-1	<i>EcoRI</i>	SP6	理化学研究所、岡本仁博士より供与
<i>zic3</i>	cb807	<i>NotI</i>	T7	ZIRC

Table 2. EMSA に用いたオリゴの配列

オリゴ名	配列	プライマーの向き
Lmo3-ab-s	5'-GATAATTA <del>AA</del> CTAATTAGTTCCCCTGTG-3'	sense
Lmo3-ab-as	5'-CACAGGGGAACTAATTAGTTTAATTATC-3'	antisense
S4Gx1s	5'-CATTGTGGCGCTAATATAAAAAACATGTTG-3'	antisense
S4Gx1as	5'-CAACATGTTTTTTTATATTAGCGCCACAATG-3'	sense
S4Gx2s	5'-GCAAAGAGGAATAATAACAAA <del>AA</del> CTAAATTC-3'	sense
S4Gx2as	5'-GAATTTAGTTTTGTTATTATTCCTCTTTGC-3'	antisense
S4Gx3s	5'-CTTATAATGACAAGCTTAATTATATGTAGA-3'	sense
S4Gx3as	5'-TCTACATATAATTAAGCTTGTCATTATAAG-3'	antisense
S4Gx3mut-s	5'-CTTATAATGACAAGCTT <u>ACGG</u> GATATGTAGA-3'	antisense
S4Gx3mut-as	5'-TCTACATAT <u>CCG</u> TAAGCTTGTCATTATAAG-3'	sense

注) 変異を入れた部分を下線で示す。

**Table 3. 作製した人工 *gbx2* 遺伝子がコードするアミノ酸領域と用いたプライマー**

遺伝子名	コードされたアミノ酸領域	作製に用いたプライマー
Gbx2	+1 aa ~ +342 aa	Gbx2-2S-2 / Gbx2-HDC-AS
Gbx2-HD	+212 aa ~ +300 aa	Gbx2-212S-2 / zGbx2.303AS
Gbx2-ΔN	+212 aa ~ +342 aa	Gbx2-212S-2 / Gbx2-HDC-AS
Gbx2-ΔC	+1 aa ~ +300 aa	Gbx2-2S-2 / zGbx2.303AS
Gbx2-ND	+1 aa ~ +210 aa	Gbx2-2S-2 / zGbx2.213AS
Gbx2-ΔEh1/-ΔEC	+1 aa ~ +19 aa, +31 aa ~ +342 aa / +31 aa ~ +300 aa	Gx2dEh1-s(Bam) / Gx2dEh1-as(Bam)
Gbx2-ΔIVR/-ΔIC	+1 aa ~ +30 aa, +55 aa ~ +342 aa / +55 aa ~ +300 aa	Gx2dInt-s2(Bam) / Gx2dInt-as(Bam)
Gbx2-ΔPro/-ΔPC	+1 aa ~ +55 aa, +65 aa ~ +342 aa / +65 aa ~ +300 aa	Gx2dPro-s(Bam) / Gx2dPro-as(Bam)
Gbx2-ΔEP	+1 aa ~ +19 aa, +31 aa ~ +55 aa, +65 aa ~ +342 aa	Gx2dPro-s(Bam) / Gx2dEh1-as(Bam), Gx2dEh1-s(Bam) / Gx2dPro-as(Bam)
Gbx2-ΔIE	+1 aa ~ +19 aa, +55 aa ~ +342 aa	Gx2dInt-s2(Bam) / Gx2dEh1-as(Bam)
Gbx2-ΔIP	+1 aa ~ +30 aa, +65 aa ~ +342 aa	Gx2dPro-s(Bam) / Gx2dInt-as(Bam)
Gbx2-ΔNt	+20 aa ~ +342 aa	NTerm-3'(s/Bam) / NTerm-5'(as/Bam)
Gbx2-ΔLin1	+1 aa ~ +65 aa, +153 aa ~ +342 aa	Linker1-3'(s/Pst) / Linker1-5'(as/Pst)
Gbx2-ΔLin2	+1 aa ~ +152 aa, +239 aa ~ +342 aa	Linker2-3'(s/Pst) / Linker2-5'(as/Pst)
Gbx2-ΔNCR	+ 1 aa ~ + 19 aa, + 56 aa ~ +342 aa	Gx2dPro-s(Bam) / Gx2dEh1-as(Bam)



Table 4. 人工 *gbx2* コンストラクトを作製する際に使用したプライマーの配列

オリゴ名	配列	<i>gbx2</i> cDNA 上の 認識配列の位置	プライマーの向き	下線部を認識する 制限酵素
Gx2dC-s(Pst)	5'-GCCTGCAGTGATACACAGGGCTTTAGTT-3'	1439-1458	sense	<i>Pst</i> I
Gx2dC-as(Pst)	5'-GCCTGCAGTTTGACCCGTTTCCACTT-3'	1295-1312	antisense	<i>Pst</i> I
303AS-E(En)	5'-GCTCTAGAGCTTTGACCCGTTTCCACT-3'	1296-1314	antisense	<i>Xba</i> I
241S.E2(En)	5'-CGCCTCGAGTGGGAAAAATCGGAGAAG-3'	1126-1143	sense	<i>Xho</i> I
Gbx2-2S-2	5'-GCGAATTCGGAGTGCAGCTTTCAGCAC-3'	414-432	sense	<i>Eco</i> RI
Gbx2-HDC-AS	5'-GCTCTAGACTCCAATTTGTCCTGTGG-3'	1459-1477	antisense	<i>Xba</i> I
Gbx2-212S-2	5'-GCGAATTCGTCAGAAAGAAGACGGAGA-3'	1044-1062	sense	<i>Eco</i> RI
zGbx2.303AS	5'-GCTCTAGAGCTTTGACCCGTTTCCAC-3'	1297-1314	antisense	<i>Xba</i> I
zGbx2.213AS	5'-GCTCTAGACACATGGCGTTCCGGG-3'	1029-1044	antisense	<i>Xba</i> I
Gx2dEh1-s(Bam)	5'-GCGGATCCCGGCCGAGCCCAGTCCG-3'	503-520	sense	<i>Bam</i> HI
Gx2dEh1-as(Bam)	5'-GCGGATCCGGTGCTTCCCACGGACGC-3'	451-469	antisense	<i>Bam</i> HI
Gx2dInt-s2(Bam)	5'-GCGGATCCCTTCTCCGCCGCTCCT-3'	575-592	sense	<i>Bam</i> HI
Gx2dInt-as(Bam)	5'-GCGGATCCACCGCCGATGAGCGAGTCAA-3'	483-502	antisense	<i>Bam</i> HI
Gx2dPro-s(Bam)	5'-GCGGATCCCACTCCCCAAAGCGTCT-3'	605-624	sense	<i>Bam</i> HI
Gx2dPro-as(Bam)	5'-GCGGATCCAAGCACTGACCGGTATG-3'	559-577	antisense	<i>Bam</i> HI
NTerm-3'(s/Bam)	5'-GCGGATCCACTGCATTGAGCATTGAC-3'	470-487	sense	<i>Bam</i> HI
NTerm-5'(as/Bam)	5'-GCGGATCCCGAATTCCTCCCATGGAC-3'	(Flag tag 上)	antisense	<i>Bam</i> HI
Linker1-3'(s/Pst)	5'-CGCCTGCAGGATTGACGAGCATTCCGTC-3'	869-888	sense	<i>Pst</i> I
Linker1-5'(as/Pst)	5'-CGCCTGCAGTGTGGAGGGGGTGGAG-3'	591-607	antisense	<i>Pst</i> I
Linker2-3'(s/Pst)	5'-CGCCTGCAGGGGAAAAATCGGAGAAGGAG-3'	1127-1146	sense	<i>Pst</i> I
Linker2-5'(as/Pst)	5'-CGCCTGCAGTTTCGTCGCAAACGTTTTCC-3'	849-868	antisense	<i>Pst</i> I

注)mRNA 合成に際して、各コンストラクトは*Sac*II で直線化した。

Table 5. Q-PCR に用いたプライマー配列

遺伝子名	配列	プライマーの向き
18S RNA	5'-CGAAAGTCGGAGGTTCGAAG-3'	sense
	5'-AGCTTTGCAACCATACTCCC-3'	antisense
<i>egr2b</i>	5'-TGTGAGTCTCGGTGGCTTTGTG-3'	sense
	5'-GCTGCTGGAGTAGGCTAAGTC-3'	antisense
<i>foxi1</i>	5'-AAGTTGCACGGGATGAGGATGA-3'	sense
	5'-CAGACTGGAAGTGTCCGCCAAT-3'	antisense
<i>gbx2</i>	5'-ATTCCGTCCTTCCACGATTC-3'	sense
	5'-TTCCTTCTGACACATGGCGT-3'	antisense
<i>gbx2</i> 3'-UTR	5'-TGGTCTCTGCTGAAGCACATGATA-3'	sense
	5'-GTGCCCGTGATGTCTTAAATGGTT-3'	antisense
<i>her5</i>	5'-AGGAGAGATCGCATTAAATCAAAGCC-3'	sense
	5'-AGGGTCAGTTTCTGATGCTTGTTCA-3'	antisense
<i>hoxa3a</i>	5'-CGTATCACCAACACCATCCACAAGG-3'	sense
	5'-TCCACGAGTTGAGCAGATGTGTATG-3'	antisense
<i>hoxb5b</i>	5'-GAAGCAAGAATCTGTGGCGACCT-3'	sense
	5'-GAGCGTCTGGTAGCGAGTGTA-3'	antisense
<i>hoxc6b</i>	5'-GACTGTGGAACCGAAAGGAGTTGTT-3'	sense
	5'-TCTCAATTTCGTCTGCGTCTTGTCAA-3'	antisense
<i>lhx8a</i>	5'-GGTATCGTGTTTCGTTCGTTGT-3'	sense
	5'-TGATGTGTCTGCCAGAGATGTTTG-3'	antisense
<i>neurog1</i>	5'-TTGAGGGTTAAGAGCAAGACAGACG-3'	sense
	5'-GAGTAGTCACAGCTTGAGGTTTCCA-3'	antisense
<i>otx1b</i>	5'-TCAACCTTCCCGAGTCCCGAG-3'	sense
	5'-GTGAACTGGCCGCTGCTCTCA-3'	antisense
<i>otx2</i>	5'-CAACCACCTTACACGGTCAACG-3'	sense
	5'-GCGAATAAAGCCTCCAGCACAT-3'	antisense
<i>pax2a</i>	5'-TAGGAATCCCTCGCTCCAACG-3'	sense
	5'-CGCTCAAACACCCGATCCAGA-3'	antisense
<i>pou3f2</i>	5'-TCCTCACCTCCAGTCCATCTATTGT-3'	sense
	5'-TTCTCCGTGTGACAAGGCTGTTATC-3'	antisense
<i>six3b</i>	5'-GCACAAGCCACTGGACTGACTC-3'	sense
	5'-GCAGCCCGATTCTGACATGGAG-3'	antisense
<i>slc6a3</i>	5'-CCTGGTGCCGTATCTCCTCTTCA-3'	sense
	5'-CCACATACAGCGAGATCAGGATCAC-3'	antisense

Table 6. その他のオリゴの配列

オリゴ名	配列	下線部を認識する制限酵素
hsp-5Xh	5'-GCCTCGAGTCAGGGGTGTCGCTTGGTTA-3'	<i>Xho</i> I
hsp-3Hin	5'-GCAAGCTTGATCATCGAATTCCTGCAGGA-3'	<i>Hind</i> III
S42-MluI-s	5'-CCCACGCGTCATTTCTTTCTTTGC-3'	<i>Mlu</i> I
S42-XhoI-as	5'-CCCCTCGAGATTGTGGCTAATCAAAT-3'	<i>Xho</i> I
TOL2-MCS-s	5'-GATCTGATATCAAGCTTGGATCCATCGATCTGCAGGTCGACC-3'	
Tol2-MCS-as2	5'-TCGAGGTCGACCTGCAGATCGATGGATCCAAGCTTGATATCA-3'	
pCS2toTol2-s(RV)	5'-GCGTTCGACGCCTCTTCGCTATTACGCCA-3'	<i>Sal</i> I
pCS2toTol2-as(RV)	5'-GCGTTCGACGGCCGCGAATTA AAAAACCTC-3'	<i>Sal</i> I
T2AexR	5'-ACCCAAGTATCTTCAGCATCT-3'	
T2AexL	5'-CGCAATTAACCCTCACTAAAGG-3'	
hsp-down.3	5'-GAACAGACGGGCATTTACTT-3'	
Gx2dN-as(Pst-2)	5'-GCCTGCAGCCGAATTCCTCCCATGGA-3'	<i>Pst</i> I
fe37b04-F	5'-GCAGCTTTTGTGTCTGCTTG-3'	
fe37b04-R	5'-GGTTTGTCTGCATCAGATACG-3'	
TnT-3	5'-GCCTCTTCGCTATTACGCCA-3'	
T3 Primer	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	
hesx1-s-RI	5'-GCGAATTCTTGAGTTTAGCAATGGCTTCTC-3'	<i>Eco</i> RI
hesx1-as-Xb	5'-GCTCTAGATCTACTCTCAGTGTTCTTCTCTGC-3'	<i>Xba</i> I
klf2a-s-Bam	5'-GCGGATCCAAATGGCTTTGAGTGGAACG-3'	<i>Bam</i> HI
klf2a-as-RI	5'-GCGAATTCCATTTCCAGAGTCCGTTCC-3'	<i>Eco</i> RI
cb332-s-T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	
cb332-as-T3	5'-GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAAGAGCTATGACGTC-3'	

Table 7. 26 hpf における *gbx2* 強制発現胚の形態

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		<i>ft-gbx2</i>											
mRNA amount (pg/emb)	30		5		10	15	30		30		50		100			
Total embryos	186		144		34	48	272		56		95		85			
Phenotype (%)																
Dead	7	(3.8)	0	(0.0)	1	(2.9)	1	(2.1)	22	(8.1)	3	(5.4)	4	(4.2)	8	(9.4)
Defect*	Axis or Gustrulation															
	5	(2.7)	0	(0.0)	1	(2.9)	0	(0.0)	71	(26.1)	0	(0.0)	21	(22.1)	29	(34.1)
	Fore-/Midbrain															
	4	(2.2)	9	(6.3)	20	(58.8)	26	(54.2)	190	(69.9)	9	(16.1)	66	(69.5)	58	(68.2)
	Isthmus															
	18	(9.7)	49	(34.0)	7	(20.6)	13	(27.1)	9	(3.3)	25	(44.6)	9	(9.5)	9	(10.6)
	Isthmus&Midbrain															
	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
	Eyes															
	20	(10.8)	17	(11.8)	26	(76.5)	33	(68.8)	198	(72.8)	14	(25.0)	69	(72.6)	62	(72.9)
	Otic Vesicle															
	13	(7.0)	2	(1.4)	0	(0.0)	0	(0.0)	47	(17.3)	0	(0.0)	15	(15.8)	5	(5.9)
	Tail															
	16	(8.6)	6	(4.2)	3	(8.9)	0	(0.0)	73	(26.8)	0	(0.0)	20	(21.1)	10	(11.8)
Normal	149	(80.1)	86	(59.7)	3	(8.8)	7	(14.6)	16	(5.9)	19	(33.9)	6	(6.3)	0	(0.0)

\* Axis or Gustrulation: 不定形、軸のねじれ、軸の屈曲  
Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
Isthmus: 峡部のみ欠損  
Isthmus&Midbrain: 峡部欠損及び中脳異常  
Eyes: 眼の欠損、単眼、眼が小さい  
Tail: 尾の欠損、巻き上がり、折れ曲がり、伸長不全

**Table 8. *gbx2* 強制発現胚における初期脳マーカー発現**

A. <i>six3b, pax2a, egr2b</i>																					
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level										ii) Position							
				normal	<i>six3b</i>		reduced		reduced		reduced		reduced		expanded		shifted				
					<i>pax2a</i>		reduced		reduced		reduced		reduced		expanded						
					<i>egr2b</i>		reduced		reduced		reduced		reduced		expanded						
<i>egfp</i>	30	22	19 (86.4)	19	(86.4)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	3	(13.6)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	28	5 (17.9)	5	(17.9)	1	(3.6)	1	(3.6)	9	(32.1)	9	(32.1)	2	(7.1)	1	(3.6)	14	(50.0)		
<i>gbx2</i>	5	18	16 (88.9)	16	(88.9)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(11.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)		

B. <i>otx2</i>									
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level					
				normal	reduced		abrogated		
<i>egfp</i>	30	21	21 (100)	21	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	34	0 (0.0)	0	(0.0)	9	(30.0)	25	(73.5)
<i>gbx2</i>	5	35	1 (2.9)	1	(2.9)	31	(88.6)	3	(8.6)

C. <i>fgf8</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level						ii) Position			
				normal	expanded		reduced		abrogated		shifted		
<i>egfp</i>	30	23	22 (95.7)	22	(95.7)	0	(0.0)	1	(4.3)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	28	9 (32.1)	9	(32.1)	18	(64.3)	1	(3.6)	0	(0.0)	18	(64.3)
<i>gbx2</i>	5	31	30 (96.8)	30	(96.8)	0	(0.0)	1	(3.2)	0	(0.0)	1	(3.2)

D. <i>wnt1</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level						ii) Position			
				normal	expanded		reduced		abrogated		shifted		
<i>egfp</i>	30	22	22 (100)	22	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	23	0 (0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	13	(56.5)	10	(43.5)	11	(47.8)
<i>gbx2</i>	5	22	17 (77.3)	17	(77.3)	0	(0.0)	5	(22.7)	0	(0.0)	0	(0.0)

E. <i>gbx1</i>											
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level						ii) Position	
				normal	reduced		abrogated		shifted		
<i>egfp</i>	30	20	18 (90.0)	18	(90.0)	2	(10.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	20	6 (30.0)	6	(30.0)	11	(55.0)	3	(15.0)	11	(55.0)
<i>gbx2</i>	5	17	12 (70.6)	12	(70.6)	4	(23.5)	1	(5.9)	8	(47.1)

**Table 9. *gbx2* 強制発現胚における24 hpf での脳マーカー発現**

A. <i>six3b</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	normal		reduced		abrogated					
<i>egfp</i>	30	3		3	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)				
<i>gbx2</i>	30	36		8	(22.2)	21	(58.3)	7	(19.4)				
<i>gbx2</i>	5	24		23	(95.8)	0	(0.0)	1	(4.2)				

B. <i>pax2a</i>															
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level								ii) Position			
				normal		reduced						shifted			
						(OS)	(MHB)	(OS&MHB)	(OS,MHB&OV)						
<i>egfp</i>	30	29		29	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	23		3	(13.0)	6	(26.1)	2	(8.7)	8	(34.8)	4	(17.4)	8	(34.8)
<i>gbx2</i>	5	25		21	(84.0)	0	(0.0)	4	(16.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	13	(52.0)

C. <i>egr2b</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level				r3 expanded					
				normal				normal		shifted			
<i>egfp</i>	30	16		16	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	16		2	(12.5)	8	(50.0)	0	(0.0)	6	(37.5)		
<i>gbx2</i>	5	20		20	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)		

D. <i>otx2</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	normal		reduced		abrogated					
<i>egfp</i>	30	29		29	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)				
<i>gbx2</i>	30	19		0	(0.0)	10	(52.6)	9	(47.4)				
<i>gbx2</i>	5	26		12	(46.2)	13	(50.0)	1	(3.8)				

E. <i>fgf8</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level				reduced				abrogated	
				normal				normal		shifted			
<i>egfp</i>	30	15		15	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	16		1	(6.3)	7	(43.8)	5	(31.3)	5	(31.3)	3	(18.8)
<i>gbx2</i>	5	21		12	(57.1)	5	(23.8)	4	(19.0)	3	(14.3)	0	(0.0)

F. <i>wnt1</i>													
Gene name	mRNA amount (pg/emb)	Total embryos	Phenotype (%)	i) Level				reduced				abrogated	
				normal				normal		shifted			
<i>egfp</i>	30	19		19	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
<i>gbx2</i>	30	12		2	(16.7)	2	(16.7)	0	(0.0)	5	(41.7)	3	(25.0)
<i>gbx2</i>	5	18		11	(61.1)	7	(38.9)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)

**Table 10. 24 hpf における改変型 *gbx2* 強制発現胚の形態**

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		<i>en-gbx2</i>		<i>vp-gbx2</i>		
mRNA amount (pg/emb)	100		30		30		100		
Total embryos	20		23		45		41		
Phenotype (%)									
Dead	1	(5.0)	0	(0.0)	19	(42.2)	0	(0.0)	
Defect*	Axis or Gustrulation	0	(0.0)	7	(30.4)	11	(24.4)	7	(17.1)
	Fore-/Midbrain	1	(5.0)	19	(82.6)	15	(33.3)	13	(31.7)
	Isthmus	7	(35.0)	1	(4.3)	0	(0.0)	0	(0.0)
	Swollen MB	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	21	(51.2)
	Eyes	7	(35.0)	18	(78.3)	18	(40.0)	12	(29.3)
	Otic Vesicle	1	(5.0)	10	(43.5)	1	(2.2)	10	(24.4)
	Tail	2	(10.0)	9	(39.1)	11	(24.4)	18	(43.9)
Normal	11	(55.0)	2	(8.7)	2	(4.4)	5	(12.2)	

- \* Axis or Gustrulation: 不定形、軸のねじれ、軸の屈曲  
 Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Swollen MB: 峡部欠損及び中脳異常  
 Eyes: 眼の欠損、単眼、眼が小さい  
 Otic Vesicle: 耳胞及び耳石の形成不全  
 Tail: 尾の欠損、巻き上がり、折れ曲がり、伸長不全

**Table 11. 28 hpf における N/C 末欠失 *gbx2* の強制発現胚の形態**

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		<i>gbx2-HD</i>		<i>gbx2-ΔN</i>		<i>gbx2-ΔC</i>		<i>gbx2-ND</i>		
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		50		
Total embryos	45		58		31		26		41		52		
Phenotype (%)													
Dead	4	(8.9)	7	(12.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(2.4)	0	(0.0)	
Defect*	Axis or Gustrulation	0	(0.0)	22	(37.9)	3	(9.7)	4	(15.3)	0	(0.0)	2	(3.8)
	Fore-/Midbrain	2	(4.4)	37	(63.8)	2	(6.5)	8	(30.8)	12	(29.3)	3	(5.8)
	Isthmus	2	(4.4)	4	(6.9)	7	(22.6)	13	(50.0)	12	(29.3)	6	(11.5)
	Eyes	1	(2.2)	38	(65.5)	8	(25.8)	11	(42.3)	22	(53.7)	10	(19.2)
	Tail	6	(13.2)	8	(13.8)	1	(3.2)	0	(0.0)	3	(7.3)	5	(9.6)
Normal		36	(80.0)	0	(0.0)	17	(54.8)	4	(15.4)	13	(31.7)	37	(71.2)

\* Axis or Gustrulation: 不定形、軸のねじれ、軸の屈曲  
 Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Eyes: 眼の欠損、単眼、眼が小さい  
 Tail: 尾の欠損、巻き上がり、折れ曲がり、伸長不全



**Table 12. Bud 期における N/C 末欠失 *gbx2* 強制発現胚のマーカー発現**

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		<i>gbx2-HD</i>		<i>gbx2-ΔN</i>		<i>gbx2-ΔC</i>		<i>gbx2-ND</i>													
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		50													
Total embryos	141		127		58		88		78		64													
Phenotype (%)																								
Downregulation*	<i>six3b</i>	1	(0.7)	58	(45.7)	3	(5.2)	34	(38.6)	14	(17.9)	0	(0.0)											
	<i>pax2a</i>	0	(0.0)	74	(58.3)	2	(3.4)	46	(52.3)	12	(15.4)	4	(6.3)											
	<i>egr2b</i>	0	(0.0)	20	(15.7)	1	(1.7)	15	(17.0)	2	(2.6)	1	(1.6)											
Normal	140		(99.3)		45		(35.4)		53		(91.4)		33		(37.5)		62		(79.5)		58		(90.6)	

\* 各遺伝子の発現が減少又は消失している

**Table 13. 28 hpf における NCR 内欠失 *gbx2* の強制発現胚の形態**

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Eh1$		$\Delta Pro$		$\Delta EP$		$\Delta IVR$		$\Delta NCR$		
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		50		50		
Total embryos	209		90		110		168		129		172		154		
Phenotype (%)															
Dead	5	(2.4)	8	(8.9)	1	(0.9)	41	(24.4)	2	(1.6)	4	(2.3)	2	(1.3)	
Defect*	Axis or Gustrulation	10	(4.8)	27	(30.0)	3	(2.7)	57	(33.9)	10	(7.8)	6	(3.5)	5	(3.2)
	Fore-/Midbrain	9	(4.3)	45	(50.0)	34	(30.9)	49	(29.2)	40	(31.0)	36	(20.9)	11	(7.1)
	Isthmus	5	(2.4)	4	(4.4)	14	(12.7)	3	(1.8)	10	(7.8)	8	(4.7)	13	(8.4)
	Isthmus&Midbrain	0	(0.0)	3	(3.3)	8	(7.3)	1	(0.6)	3	(2.3)	21	(12.2)	55	(35.7)
	Eyes	18	(8.6)	42	(46.7)	34	(30.9)	49	(29.2)	44	(34.1)	39	(22.7)	17	(11.0)
	Otic Vesicle	8	(3.8)	12	(13.3)	3	(2.7)	17	(10.1)	10	(7.8)	1	(0.6)	3	(1.9)
	Tail	24	(11.5)	15	(16.7)	4	(3.6)	33	(19.6)	21	(16.3)	7	(4.1)	9	(5.8)
Normal		171	(81.8)	17	(18.9)	54	(49.1)	35	(20.8)	62	(48.1)	37	(21.5)	77	(50.0)

- \* Axis or Gustrulation: 不定形、軸のねじれ、軸の屈曲  
 Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Isthmus&Midbrain: 峡部欠損及び中脳異常  
 Eyes: 眼の欠損、単眼、眼が小さい  
 Otic Vesicle: 耳胞及び耳石の形成不全  
 Tail: 尾の欠損、巻き上がり、折れ曲がり、伸長不全

Table 14. NCR 内欠失 *gbx2* の強制発現胚における脳マーカー発現

A. Bud stage															
Gene name		<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Eh1$		$\Delta Pro$		$\Delta EP$		$\Delta IVR$		$\Delta NCR$	
mRNA amount (pg/emb)		50		50		50		50		50		50		50	
Total embryos		283		126		36		196		9		15		81	
Phenotype (%)															
Downregulation*	<i>six3b</i>	6	(2.1)	93	(73.8)	7	(14.0)	125	(63.8)	4	(44.4)	1	(6.7)	2	(2.5)
	<i>pax2a</i>	4	(1.4)	95	(75.4)	11	(30.6)	120	(61.2)	7	(77.8)	2	(13.3)	8	(9.9)
	<i>egr2b</i>	2	(0.7)	35	(27.8)	5	(13.9)	22	(11.2)	1	(11.1)	1	(6.7)	2	(2.5)
	<i>six&amp;pax</i>	1	(0.4)	70	(55.6)	7	(19.4)	99	(50.5)	4	(44.4)	0	(0.0)	2	(2.5)
	<i>pax</i> only	0	(0.0)	6	(4.8)	4	(11.1)	12	(6.1)	3	(33.3)	1	(6.7)	5	(6.2)
Normal		272	(96.1)	25	(19.8)	24	(66.7)	36	(18.4)	2	(22.2)	13	(86.7)	72	(88.9)

B. 28 hpf															
Gene name		<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Eh1$		$\Delta Pro$		$\Delta EP$		$\Delta IVR$		$\Delta NCR$	
mRNA amount (pg/emb)		50		50		50		50		50		50		50	
Total embryos		28		19		25		17		11		7		29	
Phenotype (%)															
Downregulation*	<i>six3b</i>	0	(0.0)	18	(94.7)	13	(52.0)	13	(76.5)	9	(81.8)	0	(0.0)	2	(6.9)
	<i>pax2a</i>	0	(0.0)	16	(84.2)	22	(88.0)	11	(64.7)	10	(90.9)	7	(100)	27	(93.1)
	<i>egr2b</i>	0	(0.0)	2	(10.5)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(3.4)
	<i>six&amp;pax</i>	0	(0.0)	17	(89.5)	13	(52.0)	9	(52.9)	9	(81.8)	0	(0.0)	2	(6.9)
	<i>pax</i> only	0	(0.0)	0	(0.0)	9	(36.0)	2	(11.8)	1	(9.0)	7	(100)	23	(79.3)
Normal		28	(100)	1	(5.3)	2	(8.0)	2	(11.8)	1	(9.0)	0	(0.0)	1	(3.4)

\* 各遺伝子の発現が減少又は消失している  
*six&pax*: *six3b* と *pax2a* が同時に減少又は消失している  
*pax* only: *pax2a* のみ減少又は消失しており、*six3b*, *egr2b* は正常

Table 15. 改変型 *gbx2* 遺伝子が持つ背側化活性について

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx1</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Eh1$		$\Delta Pro$		$\Delta NCR$		<i>en-gbx2</i>	
mRNA amount (pg/emb)	50		25		50		50		50		50		5	
Total embryos	243		49		115		36		123		33		52	
Phenotype (%)														
Elongation*	5	(2.1)	23	(46.9)	3	(2.6)	1	(2.8)	42	(34.1)	0	(0.0)	13	(25.0)
Expression pattern of <i>six3b</i> , <i>pax2a</i> , <i>egr2b</i>														
Anterior shift	0	(0.0)	27	(55.1)	45	(39.1)	0	(0.0)	64	(52.0)	0	(0.0)	10	(19.2)
Ventral expansion	2	(0.8)	4	(8.2)	17	(13.0)	0	(0.0)	41	(33.3)	0	(0.0)	7	(13.5)

\* Elongation: 側方から観察して、背腹軸方向に1.2倍以上の伸張が見られる

**Table 16. 28 hpfにおける欠失*gbx2* の強制発現胚の形態**

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Eh1$		$\Delta IVR$		$\Delta Pro$		$\Delta IP$		$\Delta EP$		$\Delta EI$		$\Delta NCR$		
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		50		50		50		50		
Total embryos	209		90		110		172		168		151		129		152		154		
Phenotype (%)																			
Dead	5 (2.4)		8 (8.9)		1 (0.9)		4 (2.3)		41 (24.4)		4 (2.6)		2 (1.6)		5 (3.3)		2 (1.3)		
Defect*	Fore-/Midbrain	9 (4.3)		45 (50.0)		34 (30.9)		36 (20.9)		49 (29.2)		35 (23.2)		40 (31.0)		11 (7.2)		11 (7.1)	
	Isthmus	5 (2.4)		4 (4.4)		14 (12.7)		8 (4.7)		3 (1.8)		46 (30.5)		10 (7.8)		56 (36.8)		13 (8.4)	
	Isthmus&Midbrain	0 (0.0)		3 (3.3)		8 (7.3)		21 (12.2)		1 (0.6)		3 (2.0)		3 (2.3)		9 (5.9)		55 (35.7)	

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta Nt$		$\Delta Lin1$		$\Delta Lin2$		
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		
Total embryos	65		164		33		159		75		
Phenotype (%)											
Defect*	Fore-/Midbrain	1 (1.5)		39 (23.8)		8 (24.9)		26 (16.4)		14 (18.7)	
	Isthmus	4 (6.2)		35 (21.3)		9 (27.3)		30 (18.7)		18 (24.0)	

Gene name	<i>egfp</i>		<i>gbx2</i>		$\Delta EC$		$\Delta IC$		$\Delta PC$		
mRNA amount (pg/emb)	50		50		50		50		50		
Total embryos	70		87		60		35		62		
Phenotype (%)											
Dead	0 (0.0)		1 (1.1)		0 (0.0)		0 (0.0)		4 (6.5)		
Defect*	Fore-/Midbrain	1 (1.4)		19 (21.8)		0 (0.0)		2 (5.7)		16 (25.8)	
	Isthmus	1 (1.4)		17 (19.5)		1 (2.0)		5 (14.3)		4 (6.5)	
	Isthmus&Midbrain	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)		1 (2.9)		0 (0.0)	

\* Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Isthmus&Midbrain: 峡部欠損及び中脳異常

**Table 17. 強制発現胚及び *ace* の耳胞の大きさについて**

A. 強制発現胚 (28 hpf)

Gene name		<i>egfp</i>	<i>gbx2</i>	$\Delta Eh1$	$\Delta NCR$
mRNA amount (pg/emb)		50	50	50	50
Total embryos		6	2	4	6
Average of breadth ( $\mu\text{m}$ )	Long axis	81.4	80.0	69.0	80.0
	Short axis	52.4	62.1	62.1	58.0
Short/Long		0.65	0.85	0.93	0.72

B. *ace* (28 hpf)

Genotype		<i>ace</i> (+/)	<i>ace</i> (-/-)
Total embryos		5	11
Average of breadth ( $\mu\text{m}$ )	Long axis	86.4	45.8
	Short axis	59.4	33.5
Short/Long		0.70	0.74

**Table 18. *hsp-gbx2* 導入胚の形態と *gbx2* 発現**

**A. 加温処理直後の胚における *gbx2* 発現**

Gene name	-	-	-	-	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>
Heat shock	-	-	+	-	-	-	+	+
Total embryos	16	11			18		12	
Ectopical expression* (%)								
++	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	10	(83.3)
+	0	(0.0)	0	(0.0)	13	(72.2)	0	(0.0)
-	16	(100)	11	(100)	3	(27.8)	2	(16.7)

\* ++: 50%以上の細胞で発現  
 +: 50%未満の細胞で発現  
 -: 異所的な発現なし

**B. Prim-5 期での形態**

Gene name	-	-	-	-	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>
Heat shock	-	-	+	-	-	-	+	+
Total embryos	15	13			19		11	
Phenotype (%)								
Dead	0	(0.0)	2	(15.4)	2	(10.5)	2	(18.2)
Defect**								
Gastrulation	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	3	(27.3)
Fore-/Midbrain	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(5.3)	3	(27.3)
Isthmus	0	(0.0)	1	(7.7)	0	(0.0)	0	(0.0)
Tail	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(5.3)	0	(0.0)
Normal	15	(100)	10	(76.9)	16	(84.2)	3	(27.3)

\*\* Gastrulation: 不定形  
 Fore-/Midbrain: 前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Tail: 尾の伸長不全

**Table 19. *hsp-gbx2* 導入胚において異なる処理時間で加温した場合の形態**

A. Morphology (Soon after heat shock)

Gene name	-		-		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>	
Heat shock time (min.)	0		20		0		5		10		15		20	
Total embryos	30		36		29		30		29		29		31	
Phenotype (%)														
Dead	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(6.9)	1	(3.2)
Yolk explosion*	0	(0.0)	2	(5.6)	0	(0.0)	1	(3.3)	6	(20.7)	2	(6.9)	5	(16.1)
Normal	30	(100)	34	(94.4)	29	(100)	29	(96.7)	23	(79.3)	25	(86.2)	25	(80.7)

B. Morphology (Prim-5 stage)

Gene name	-		-		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>		<i>hsp-gbx2</i>											
Heat shock time (min.)	0		20		0		5		10		15		20											
Total embryos	30		25		19		19		16		18		17											
Phenotype (%)																								
Dead	1	(3.3)	0	(0.0)	1	(5.3)	3	(15.8)	3	(18.8)	2	(11.1)	2	(11.8)										
Defect**																								
Fore-/Midbrain	0	(0.0)	1	(4.0)	2	(10.5)	3	(15.8)	0	(0.0)	1	(5.6)	3	(17.6)										
Isthmus	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)										
Isthmus&Midbrain	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)										
Eyes	0	(0.0)	1	(4.0)	4	(21.1)	5	(26.3)	3	(18.8)	2	(11.1)	5	(29.4)										
Normal	29	(96.7)	23	(92.0)	13	(68.4)	11	(57.9)	8	(50.0)	12	(66.7)	9	(52.9)										
Egfp expression/Live (%)	-		-		15		(83.3)		16		(100)		11		(84.6)		15		(93.8)		12		(80.0)	

\* 卵黄は破裂しているが、胚体が黒ずんでいないもの

\*\* Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Isthmus&Midbrain: 峡部欠損及び中脳異常  
 Eyes: 眼の欠損、単眼、眼が小さい



Table 20. 異なる処理時間で加温した *hsp-gbx2* 導入胚での *gbx2* 発現

Gene name	-	-	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>	<i>hsp-gbx2</i>
Heat shock time (min.)	0	20	0	5	10	15	20
Total embryos	7	7	9	10	7	7	7
Ectopical expression* (%)							
++	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	3 (42.9)	4 (57.1)	4 (57.1)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (77.8)	5 (50.0)	4 (57.1)	3 (42.9)	3 (42.9)
-	7 (100)	7 (100)	2 (22.2)	3 (30.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

\* ++: 50%以上の細胞で発現  
 +: 50%未満の細胞で発現  
 -: 異所的な発現なし

**Table 21. *hsp-gbx2* 導入胚に異なる発生時期に加温処理を行った場合の形態**

A. Survival (Soon after heat shock)

	HS stage	HS	Total	Alive (%)	
control	50% epiboly	-	32	32	(100)
		+	30	27	(90.0)
	bud	-	5	5	(100)
		+	5	4	(80.0)
	4/6-somite	+	12	12	(100)
14/16-somite	+	11	11	(100)	
<i>hsp-gbx2</i>	50% epiboly	-	38	38	(100)
		+	30	23	(76.7)
	bud	-	20	20	(100)
		+	33	3	(9.0)
	2-somite	+	13	0	(0.0)
	4/6-somite	+	15	15	(100)
14/16-somite	+	15	15	(100)	

\* Axis: 不定形、軸のねじれ、軸の屈曲  
 Fore-/Midbrain: 全脳欠損、前中脳形成不全  
 Isthmus: 峡部のみ欠損  
 Tail: 尾の欠損、巻き上がり、折れ曲がり、伸長不全

B. Morphology (Prim-5 stage)

	HS stage	HS	Total	Phenotype (%)											
				Dead		Defect*								Normal	
						Axis	Fore-/Midbrain	Isthmus	Tail						
control	50% epiboly	-	15	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	15	(100)
		+	13	2	(15.4)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(7.7)	0	(0.0)	10	(76.9)
	bud	-	2	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(100)
		+	5	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	5	(100)
	4/6-somite	+	12	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	12	(100)
14/16-somite	+	11	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	11	(100)	
<i>hsp-gbx2</i>	50% epiboly	-	19	2	(10.5)	0	(0.0)	1	(5.3)	0	(0.0)	1	(5.3)	16	(84.2)
		+	11	2	(18.2)	3	(27.3)	3	(27.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	3	(27.3)
	bud	-	15	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(13.3)	0	(0.0)	2	(13.3)	10	(66.7)
		+	3	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(66.7)	1	(33.3)
	4/6-somite	+	15	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	15	(100)
	14/16-somite	+	15	0	(0.0)	1	(6.7)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	14	(93.3)

Table 22. マイクロアレイ解析で発現上昇が見出された遺伝子 (35°C, 15 min., 0 hph)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.11151.1.A1_at	---	---	Dr.11151	---	31.1	P	84.3	P	1.4	I
Dr.17.1.A1_at	<i>LOC100001826</i>	<i>SH3-binding kinase 1-like</i>	Dr.18631	641564	50.9	P	143.7	P	1.2	I
Dr.18631.2.A1_at	<i>zgc:123295</i>	<i>zgc:123295</i>	Dr.116006	100001826	104.9	P	192.2	P	1.2	I
Dr.19488.1.A1_at	<i>fam46c</i>	<i>family with sequence similarity 46, member C</i>	Dr.77910	327154	44.7	P	163.0	P	1.1	I
Dr.13531.1.A1_at	<i>tmem35</i>	<i>transmembrane protein 35</i>	Dr.119956	792160	101.3	P	209.1	P	1.0	I
Dr.17142.1.A1_at	<i>zgc:77409</i>	<i>zgc:77409</i>	Dr.133674	403005	32.9	P	72.3	P	1.0	I
Dr.914.1.A1_a_at	<i>irf11</i>	<i>interferon regulatory factor 11</i>	Dr.43215	791920	52.1	P	84.7	P	1.0	I
Dr.23470.1.S1_s_at	<i>krml2.2</i>	<i>Kreisler (mouse) maf-related leucine zipper homolog 2.2</i>	Dr.81287	114463	64.8	P	152.1	P	0.9	I
Dr.15006.1.S1_at	<i>zgc:172295</i>	<i>zgc:172295</i>	Dr.90487	100136866	37.5	P	98.1	P	0.9	I
Dr.8152.1.S1_at	<i>slc40a1</i>	<i>solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1</i>	Dr.121812	---	62.2	P	123.6	P	0.8	I
Dr.2561.1.S1_at	<i>zgc:56066</i>	<i>zgc:56066</i>	Dr.77772	393282	149.5	P	380.1	P	0.8	I
Dr.16296.1.S1_x_at	<i>LOC100149669</i>	<i>gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1-like</i>	---	325514	324.4	P	553.5	P	0.8	I
Dr.13616.1.A1_at	---	---	Dr.81317	58153	157.4	P	263.0	P	0.8	I
Dr.9043.1.S1_at	<i>npepl1</i>	<i>aminopeptidase-like 1</i>	Dr.152438	100148286	70.0	P	132.8	P	0.8	I
Dr.5929.1.S1_at	<i>LOC100148286</i>	<i>radial spokehead-like 1-like</i>	Dr.132385	---	57.7	P	92.5	P	0.8	I
Dr.2087.1.A1_at	<i>wu:fc84b06</i>	<i>wu:fc84b06</i>	Dr.72232	550383	206.3	P	217.6	P	0.8	I
Dr.16147.2.A1_at	<i>osgepl1</i>	<i>O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1</i>	Dr.123156	---	27.3	P	66.5	P	0.8	I
Dr.21310.1.A1_at	---	---	Dr.16147	368635	297.6	P	525.7	P	0.8	I
Dr.23819.1.A1_at	---	---	---	100149669	142.6	P	296.9	P	0.8	I
Dr.221.1.S1_at	<i>pou3f2</i>	<i>POU class 3 homeobox 2</i>	Dr.76196	336623	40.7	P	67.1	P	0.7	I
Dr.10311.1.S2_at	<i>lmna</i>	<i>lamin A</i>	Dr.115604	794319	50.5	P	89.9	P	0.7	I
Dr.24774.1.S2_at	<i>hoxa3a</i>	<i>homeo box A3a</i>	Dr.77267	652952	44.2	P	84.5	P	0.7	I
Dr.25762.1.S1_at	<i>zgc:55815</i>	<i>zgc:55815</i>	---	797090	230.5	P	461.3	P	0.7	I
Dr.24902.1.S1_at	<i>si:ch211-133n4.4</i>	<i>si:ch211-133n4.4</i>	---	---	1020.1	P	1832.2	P	0.7	I
Dr.955.1.A1_at	<i>flna</i>	<i>filamin A, alpha (actin binding protein 280)</i>	---	322163	148.2	P	229.3	P	0.7	I
Dr.16296.1.S1_a_at	<i>si:dkeyp-13a3.6</i>	<i>si:dkeyp-13a3.6</i>	Dr.74540	559260	467.1	P	753.4	P	0.7	I
Dr.14535.1.S1_at	<i>LOC566030</i>	<i>similar to LOC562179 protein</i>	Dr.83518	566030	96.7	P	146.5	P	0.7	I
Dr.17943.1.A1_at	<i>gsnb</i>	<i>Gelsolin b</i>	Dr.80161	572562	191.8	P	228.4	P	0.7	I
Dr.4010.1.A1_at	<i>fam46c</i>	<i>family with sequence similarity 46, member C</i>	Dr.77910	327154	249.6	P	466.1	P	0.7	I
Dr.79.1.A1_at	<i>col14a1</i>	<i>collagen, type XIV, alpha 1</i>	Dr.36307	562529	142.9	P	176.3	P	0.7	I
Dr.19458.1.A1_at	<i>zgc:100817</i>	<i>zgc:100817</i>	Dr.221	30397	155.6	P	253.4	P	0.7	I
Dr.25123.1.A1_at	<i>wu:fb51h11</i>	<i>wu:fb51h11</i>	---	100307084	100.4	P	188.9	P	0.7	I
Dr.24471.1.A1_at	---	---	Dr.42087	560313	96.4	P	180.2	P	0.7	I

Table 22 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.12878.1.S1_at	<i>ogt.2</i>	<i>O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) 2</i>	Dr.10311	195815	42.1	P	88.0	P	0.7	I
Dr.17899.1.A1_at	<i>cul4b</i>	<i>cullin 4B</i>	Dr.76834	321298	43.4	P	75.6	P	0.7	I
Dr.413.1.S1_at	<i>LOC792823</i>	<i>Hypothetical LOC792823</i>	Dr.77839	323559	23.5	P	50.5	P	0.7	I
Dr.3715.1.A1_at	<i>grcc10</i>	<i>gene rich cluster, C10 gene</i>	Dr.32618	58049	320.1	P	611.7	P	0.7	I
Dr.3904.1.A1_at	---	---	Dr.75232	792823	218.5	P	177.9	P	0.7	I
Dr.17745.1.A1_at	<i>LOC794319</i>	<i>natterin-like protein-like</i>	---	335827	460.5	P	830.1	P	0.7	I
Dr.6319.1.A1_at	<i>wu:ff34a03</i>	<i>wu:ff34a03</i>	Dr.82370	393145	57.7	P	96.0	P	0.7	I
Dr.26044.1.A1_at	<i>LOC797090</i>	<i>fuzzy homolog</i>	Dr.122419	---	48.7	P	103.6	P	0.7	I
DrAffx.1.85.S1_s_at	<i>hbbe1.1 /// LOC573653 /// MGC173646 /// si:busm1-118j2.5</i>	<i>hemoglobin beta embryonic-1.1 /// embryonic 1 beta-globin family member /// similar to embryonic 1 beta-globin /// si:busm1-118j2.5</i>	Dr.77550	553643	114.1	P	191.3	P	0.6	I
Dr.19254.1.A1_at	<i>foxc1b</i>	<i>forkhead box C1b</i>	Dr.104461	335781 /// 573653 /// 793447 /// 81538	158.5	P	227.8	P	0.6	I
Dr.18321.1.S1_at	<i>scarb2</i>	<i>scavenger receptor class B, member 2</i>	Dr.114892	558956	284.3	P	424.4	P	0.6	I
Dr.8198.1.A1_at	<i>krml2</i>	<i>Kreisler (mouse) maf-related leucine zipper homolog 2</i>	Dr.22056	556399	36.2	P	59.1	P	0.6	I
Dr.5565.1.S1_at	<i>selm</i>	<i>selenoprotein M</i>	Dr.106470	327127	277.3	P	397.6	P	0.6	I
Dr.18800.1.S1_at	<i>ccb12</i>	<i>cysteine conjugate-beta lyase 2</i>	Dr.76258	678649	260.0	P	426.4	P	0.6	I
DrAffx.1.74.S1_at	<i>sepw2b</i>	<i>selenoprotein W, 2b</i>	---	100149669	306.4	P	439.7	P	0.6	I
Dr.5216.1.S1_at	<i>LOC100150763</i>	<i>family with sequence similarity 49, member A-like</i>	---	324619	116.3	P	195.2	P	0.6	I
Dr.11116.1.S1_at	<i>si:dkey-78d16.2</i>	<i>si:dkey-78d16.2</i>	Dr.81043	445057	216.5	P	408.6	P	0.6	I
Dr.2945.1.A1_a_at	<i>cast</i>	<i>Calpastatin</i>	Dr.106137	100003631	1636.9	P	3300.7	P	0.6	I
Dr.1192.2.S1_at	<i>zgc:153154</i>	<i>zgc:153154</i>	Dr.75722	404623	643.2	P	987.4	P	0.6	I
Dr.11713.1.S1_at	<i>uprt</i>	<i>uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae)</i>	---	751701	132.9	P	211.4	P	0.6	I
Dr.5628.4.A2_x_at	<i>zgc:173545</i>	<i>zgc:173545</i>	Dr.77085	563084	33.1	P	56.6	P	0.6	I
Dr.16296.1.S1_at	<i>LOC100149669</i>	<i>gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1-like</i>	Dr.88103	571290	270.5	P	534.8	P	0.6	I
Dr.936.1.A1_at	<i>zgc:136929</i>	<i>zgc:136929</i>	---	336540	193.6	P	324.1	P	0.6	I
Dr.17659.1.S1_at	<i>si:rp71-1c23.2</i>	<i>si:rp71-1c23.2</i>	Dr.5216	100150763	115.7	P	189.0	P	0.6	I
Dr.4293.1.S1_at	<i>zgc:110647</i>	<i>zgc:110647</i>	Dr.80915	378438	43.0	P	64.7	P	0.6	I
Dr.12304.1.S1_at	---	---	Dr.82010	393315	130.2	P	267.0	P	0.6	I

Table 22 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.25526.1.S1_at	<i>sall4</i>	<i>sal-like 4 (Drosophila)</i>	Dr.32210	352913	60.6	P	91.2	P	0.6	I
Dr.22885.1.S1_at	<i>zgc:162698</i>	<i>Zgc:162698</i>	Dr.80015	751753	63.0	P	100.0	P	0.6	I
Dr.26025.1.A1_at	<i>nucb1</i>	<i>nucleobindin 1</i>	---	114460	584.5	P	795.3	P	0.6	I
Dr.23570.1.A1_at	<i>wu:fb13b10</i>	<i>wu:fb13b10</i>	Dr.26776	560165	178.3	P	290.7	P	0.6	I
Dr.22685.1.A1_at	<i>dusp2</i>	<i>dual specificity phosphatase 2</i>	Dr.75656	192340	133.9	P	214.3	P	0.6	I
Dr.8705.1.A1_at	<i>wu:fc35a11</i>	<i>wu:fc35a11</i>	Dr.75342	572527	87.8	P	152.1	P	0.6	I
Dr.24036.1.A1_at	<i>si:dkeyp-22b2.3</i>	<i>si:dkeyp-22b2.3</i>	Dr.83301	79375	44.8	P	70.3	P	0.6	I
DrAffx.3.1.A1_at	<i>otud4</i>	<i>OTU domain containing 4</i>	---	---	743.4	P	1085.0	P	0.6	I
Dr.184.1.S1_at	<i>b2m</i>	<i>beta-2-microglobulin</i>	Dr.117428	564515	119.6	P	189.8	P	0.5	I
Dr.14516.1.A1_at	<i>nanos</i>	<i>nanos homolog</i>	Dr.4108	260437	528.0	P	801.6	P	0.5	I
Dr.2435.1.S1_at	<i>pole2</i>	<i>polymerase (DNA directed), epsilon 2</i>	Dr.18993	402887	291.8	P	476.4	P	0.5	I
Dr.17548.1.S1_at	<i>gbx2</i>	<i>gastrulation brain homeo box 2</i>	Dr.81512	406650	452.4	P	660.4	P	0.5	I
Dr.10688.1.S1_at	<i>cdk5</i>	<i>cyclin-dependent protein kinase 5</i>	Dr.5729	58045	175.4	P	209.6	P	0.5	I
Dr.5729.1.S1_at	<i>hoxc6b</i>	<i>homeo box C6b</i>	Dr.1866	324047	360.4	P	541.6	P	0.5	I
Dr.1866.1.S1_at	<i>ndfip1</i>	<i>Nedd4 family interacting protein 1</i>	Dr.78563	386643	755.4	P	1127.6	P	0.5	I
Dr.10516.1.S1_at	<i>fam46c</i>	<i>family with sequence similarity 46, member C</i>	Dr.25756	393789	147.1	P	291.0	P	0.5	I
Dr.4108.1.S1_at	<i>msh6</i>	<i>mutS homolog 6 (E. coli)</i>	Dr.76807	334195	100.3	P	130.5	P	0.5	I
Dr.3498.1.S1_at	<i>mat1a</i>	<i>methionine adenosyltransferase I, alpha</i>	Dr.104443	171480	676.1	P	1122.4	P	0.5	I
Dr.20665.1.S1_at	<i>bbs5</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 5</i>	---	322991	82.1	P	113.6	P	0.5	I
Dr.25117.1.S1_at	<i>zgc:64043</i>	<i>zgc:64043</i>	Dr.83505	393269	211.6	P	383.5	P	0.5	I
Dr.20131.1.S1_at	<i>crabp2a</i>	<i>cellular retinoic acid binding protein 2, a</i>	---	---	267.9	P	523.2	P	0.5	I
Dr.14159.1.A1_at	<i>hdac9b</i>	<i>histone deacetylase 9b</i>	Dr.78647	445214	101.4	P	134.1	P	0.5	I
Dr.330.1.A1_at	<i>plod1b /// plod3</i>	<i>procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1b /// procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	Dr.82008	335819	1203.5	P	1900.4	P	0.5	I
Dr.1691.11.S1_at	---	---	Dr.75381	436849	78.4	P	122.2	P	0.5	I
Dr.18514.1.S1_at	<i>zgc:92739</i>	<i>zgc:92739</i>	Dr.81614	---	172.6	P	261.6	P	0.5	I
Dr.17396.1.S1_at	<i>lsmd1</i>	<i>LSM domain containing 1</i>	Dr.119789	559659	295.1	P	405.0	P	0.5	I
Dr.15945.1.A1_at	<i>si:ch211-121a2.2</i>	<i>si:ch211-121a2.2</i>	Dr.77910	327154	158.7	P	208.1	P	0.5	I
Dr.26540.1.A1_at	<i>wu:fe25c07</i>	<i>wu:fe25c07</i>	Dr.75149	334935 /// 556077	3898.2	P	5565.0	P	0.5	I
Dr.7614.1.A1_at	<i>si:dkeyp-68b7.7</i>	<i>si:dkeyp-68b7.7</i>	Dr.105878	65234	466.7	P	678.6	P	0.5	I
Dr.11066.2.A1_a_at	<i>zgc:110249 /// zgc:174288</i>	<i>zgc:110249 /// zgc:174288</i>	Dr.150526	393341	816.5	P	1238.8	P	0.5	I
Dr.14123.1.A1_at	<i>atp5ia</i>	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e, duplicate a</i>	---	326820	463.5	P	694.9	P	0.5	I

Table 22 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.13885.1.A1_at	---	---	Dr.106542	566190	302.6	P	385.7	P	0.5	I
Dr.5192.1.A1_at	<i>nr2e1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1</i>	Dr.121934	---	34.1	P	70.4	P	0.5	I
Dr.18925.1.A1_at	---	---	Dr.17548	245948	86.1	P	134.3	P	0.5	I
Dr.14520.1.A1_at	<i>wu:fb78d09</i>	<i>wu:fb78d09</i>	Dr.77075	192320	45.4	P	75.3	P	0.5	I
Dr.17743.1.A1_at	<i>pik3ip1</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1</i>	Dr.123258	100126137 /// 553601	337.2	P	532.4	P	0.5	I
Dr.22985.1.A1_at	<i>timp2b</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2b</i>	Dr.83493	140631	111.4	P	206.8	P	0.5	I
Dr.12018.1.A1_at	<i>zgc:103496</i>	<i>zgc:103496</i>	Dr.51646	30400	240.0	P	288.9	P	0.5	I
AFFX-ThrX-M_at	---	---	Dr.84273	405895	141.0	P	178.6	P	0.4	I
Dr.4047.1.S1_at	<i>cxcl14</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>	Dr.75360	556042	243.5	P	343.1	P	0.4	I
Dr.13972.1.S1_at	<i>zgc:64114</i>	<i>zgc:64114</i>	Dr.78342	30286	557.1	P	728.8	P	0.4	I
Dr.24982.1.S1_at	<i>zgc:56585</i>	<i>zgc:56585</i>	Dr.107033	767746	128.9	P	158.8	P	0.4	I
Dr.16713.1.S1_at	<i>galcb</i>	<i>galactosylceramidase b</i>	Dr.78145	677743	182.0	P	270.2	P	0.4	I
Dr.5724.1.S1_at	<i>hoxb10a</i>	<i>homeo box B10a</i>	Dr.75788	58056	239.2	P	268.8	P	0.4	I
Dr.7787.1.S1_at	<i>zgc:136826</i>	<i>zgc:136826</i>	Dr.47187	368684	1137.8	P	988.7	P	0.4	I
Dr.24758.1.A1_at	<i>zgc:153426</i>	<i>zgc:153426</i>	---	325753	229.3	P	361.2	P	0.4	I
Dr.20517.1.S1_at	<i>ndrg3a</i>	<i>N-myc downstream regulated family member 3a</i>	Dr.16713	406385	198.2	P	276.1	P	0.4	I
Dr.526.1.A1_at	<i>acss2</i>	<i>acyl-CoA synthetase short-chain family member 2</i>	Dr.24982	393297	307.8	P	416.1	P	0.4	I
Dr.26343.1.A1_at	<i>prkar2aa</i>	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha A</i>	Dr.82488	378866	387.3	P	602.8	P	0.4	I
Dr.15545.1.A1_at	<i>tomm40l</i>	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog, like</i>	---	557306	346.8	P	431.6	P	0.4	I
Dr.12986.1.A1_at	<i>fos</i>	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	Dr.22717	436626	167.4	P	228.3	P	0.4	I
Dr.9252.1.A1_at	<i>scel</i>	<i>sciellin</i>	Dr.108510	777717	265.7	P	371.8	P	0.4	I
Dr.7508.1.A1_at	<i>wu:fd08h09</i>	<i>wu:fd08h09</i>	Dr.85878	445116	494.6	P	527.2	P	0.4	I
Dr.12780.1.A1_at	<i>zgc:76872</i>	<i>zgc:76872</i>	Dr.75994	795664	83.6	P	120.0	P	0.4	I
Dr.4965.1.A1_at	<i>wu:fa56d06</i>	<i>wu:fa56d06</i>	Dr.12986	394198	561.1	P	732.5	P	0.4	I
Dr.11066.1.A1_x_at	<i>zgc:174288</i>	<i>zgc:174288</i>	---	100126137	235.8	P	346.8	P	0.4	I
Dr.13272.1.A1_at	---	---	Dr.11530	562658	572.6	P	794.6	P	0.4	I
Dr.25174.2.A1_at	<i>tcf12</i>	<i>transcription factor 12</i>	Dr.77355	407985	406.0	P	546.0	P	0.4	I
Dr.11530.1.A1_at	<i>zgc:152863</i>	<i>zgc:152863</i>	Dr.76220	58151	135.5	P	177.8	P	0.4	I
Dr.21401.1.S1_at	<i>LOC557306</i>	<i>CG11537-like</i>	Dr.92794	---	108.4	P	117.0	P	0.4	I
Dr.16687.2.A1_at	<i>zgc:91936</i>	<i>zgc:91936</i>	Dr.78085	403007	479.8	P	697.3	P	0.4	I
Dr.23348.1.A1_at	<i>bmp3</i>	<i>bone morphogenetic protein 3</i>	Dr.75329	436914	283.6	P	357.8	P	0.4	I
Dr.22717.1.A1_at	<i>dnajb6a</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6a</i>	---	---	478.2	P	746.0	P	0.4	I

Table 22 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.7337.1.S1_at	<i>slc16a3</i>	<i>solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3</i>	Dr.28785	259193	162.1	P	228.0	P	0.3	I
Dr.3566.1.S1_at	<i>llgl2</i>	<i>lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)</i>	Dr.118565	100005083	622.7	P	668.1	P	0.3	I
Dr.20738.1.S1_at	<i>ndrg3b</i>	<i>N-myc downstream regulated family member 3b</i>	Dr.80641	---	342.9	P	447.2	P	0.3	I
Dr.3411.1.S1_s_at	<i>oaz2</i>	<i>ornithine decarboxylase antizyme 2</i>	Dr.123884	---	5265.8	P	6365.6	P	0.3	I
Dr.5605.1.S1_a_at	<i>aup1 /// tubb2c</i>	<i>ancient ubiquitous protein 1 /// tubulin, beta 2c</i>	Dr.32367	324654 /// 336681	4959.0	P	5644.0	P	0.3	I
Dr.25140.5.S1_at	<i>icn2</i>	<i>ictacalcin 2</i>	Dr.82799	557970	129.2	P	177.3	P	0.3	I
Dr.2890.1.A1_at	<i>tjp2a</i>	<i>tight junction protein 2a (zona occludens 2)</i>	Dr.8026	436694	757.3	P	919.0	P	0.3	I
Dr.20010.10.A1_at	<i>hmgly</i>	<i>High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein isoforms I and Y</i>	Dr.69449	436928	374.8	P	495.0	P	0.3	I
Dr.14568.1.S1_at	<i>surf1</i>	<i>surfeit 1</i>	Dr.76695	565446	154.2	P	159.4	P	0.3	I
Dr.11476.1.A1_at	<i>atxn7l2b</i>	<i>ataxin 7-like 2b</i>	Dr.78816	100002236	72.1	P	88.8	P	0.3	I
Dr.24114.1.A1_at	<i>LOC100002236</i>	<i>similar to conserved hypothetical protein</i>	Dr.80005	327395	1947.4	P	2091.0	P	0.3	I
Dr.8026.1.A1_at	<i>comm2</i>	<i>COMM domain containing 2</i>	Dr.76731	795670	508.4	P	751.3	P	0.3	I
Dr.17780.1.S1_at	---	---	Dr.83203	---	241.1	P	366.6	P	0.3	I
Dr.17605.1.S1_at	---	---	---	323506	114.9	P	157.2	P	0.3	I
Dr.4344.1.A1_at	<i>wu:fc01a09</i>	<i>wu:fc01a09</i>	Dr.75367	406447	505.9	P	676.9	P	0.3	I
Dr.23827.1.A1_at	---	---	Dr.23391	327276	1879.6	P	2352.8	P	0.3	I
Dr.12070.1.A1_at	---	---	Dr.105468	---	258.5	P	361.4	P	0.3	I
Dr.18294.1.S1_at	<i>ptgs1</i>	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>	Dr.18294	246226	139.9	P	165.6	P	0.2	I
Dr.8209.1.S2_at	<i>foxo3b</i>	<i>forkhead box O3b</i>	Dr.78161	30296	88.8	P	78.8	P	0.0	I

**Table 23. マイクロアレイ解析で発現低下が見出された遺伝子 (35°C, 15 min., 0 hph)**

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.18562.2.A1_at	---	---	---	---	148.7	P	3.6	A	-4.3	D
Dr.3967.1.A1_at	---	---	Dr.79468	---	41.9	P	8.7	A	-1.7	D
Dr.4200.1.A1_at	<i>smyhc1</i>	<i>slow myosin heavy chain 1</i>	Dr.75622	321552	75.9	P	37.4	A	-1.3	D
Dr.1330.1.S1_at	<i>sepp1a</i>	<i>selenoprotein P, plasma, 1a</i>	Dr.121604	---	532.8	P	220.1	P	-1.1	D
Dr.839.2.S1_a_at	---	---	Dr.16350	---	335.7	P	187.4	P	-1.1	D
Dr.16350.1.A1_at	---	---	Dr.9483	352931	277.3	P	161.0	P	-1.1	D
Dr.5.1.A1_at	<i>tnfrsf19</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19</i>	Dr.67639	559725	36.4	P	18.5	A	-1.0	D
Dr.1508.1.S1_at	<i>acp5a</i>	<i>acid phosphatase 5a, tartrate resistant</i>	Dr.1508	406801	2843.8	P	1392.0	P	-0.9	D
Dr.4097.1.S1_at	<i>zgc:63514</i>	<i>zgc:63514</i>	Dr.4097	555053	72.3	P	37.9	A	-0.9	D
Dr.25331.2.A1_at	<i>pzp</i>	<i>pregnancy-zone protein</i>	---	324982	85.3	P	45.5	A	-0.9	D
Dr.5702.1.A1_at	<i>zgc:123047</i>	<i>zgc:123047</i>	Dr.85576	550534	266.5	P	135.3	P	-0.8	D
Dr.15930.1.A1_at	<i>zgc:110183</i>	<i>zgc:110183</i>	Dr.20771	553283	216.9	P	147.7	P	-0.8	D
Dr.8324.1.S1_at	<i>mxtx1</i>	<i>mix-type homeobox gene 1</i>	Dr.29783	402957	682.5	P	433.5	P	-0.7	D
Dr.17924.1.S1_at	<i>fstl1b</i>	<i>Follistatin-like 1b</i>	Dr.107565	447845	606.2	P	295.9	P	-0.7	D
Dr.3505.1.S1_at	<i>sdprb</i>	<i>serum deprivation response b</i>	Dr.89500	799220	213.9	P	129.7	P	-0.7	D
Dr.22004.1.A1_at	<i>si:dkey-56d12.4</i>	<i>si:dkey-56d12.4</i>	Dr.8324	100149566	182.6	P	121.5	P	-0.7	D
Dr.12262.1.A1_at	<i>cnksr1</i>	<i>connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1</i>	Dr.93153	324309	525.2	P	343.9	P	-0.7	D
Dr.8070.1.S1_at	<i>dbx1a</i>	<i>developing brain homeobox 1a</i>	Dr.75507	406207	1122.1	P	751.0	P	-0.6	D
Dr.25548.1.S1_at	<i>hsp90b1</i>	<i>heat shock protein 90, beta (grp94), member 1</i>	Dr.8070	30394	1197.5	P	844.5	P	-0.6	D
Dr.19753.1.S1_at	<i>mtp</i>	<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>	Dr.76602	386590	770.5	P	481.1	P	-0.6	D
Dr.13614.1.S1_at	---	---	Dr.76504	619262	1661.2	P	749.7	P	-0.6	D
Dr.16322.1.A1_at	<i>add1</i>	<i>adducin 1 (alpha)</i>	Dr.148831	555511	2405.5	P	1788.6	P	-0.6	D
Dr.6933.1.A1_at	<i>thumpd3</i>	<i>THUMP domain containing 3</i>	Dr.123072	---	214.2	P	154.0	P	-0.6	D
Dr.5627.1.A1_at	<i>zgc:113338</i>	<i>zgc:113338</i>	Dr.51235	570832	223.7	P	156.8	P	-0.6	D
Dr.96.1.A1_at	<i>c7</i>	<i>complement component 7</i>	Dr.79834	561938	230.2	P	168.6	P	-0.6	D
Dr.20445.1.A1_at	---	---	---	---	234.8	P	149.5	P	-0.6	D
Dr.16652.2.A1_at	---	---	Dr.75158	---	736.4	P	453.1	P	-0.6	D
Dr.22988.1.A1_at	<i>wu:ff82d09</i>	<i>wu:ff82d09</i>	---	337549	911.9	P	470.4	P	-0.6	D
Dr.296.1.S1_at	<i>ckbb</i>	<i>creatine kinase, brain b</i>	Dr.121290	100174951	1013.6	P	747.1	P	-0.5	D
Dr.334.1.S2_at	<i>otx2</i>	<i>orthodenticle homolog 2</i>	Dr.119793	335651	1303.7	P	989.3	P	-0.5	D
Dr.7751.1.S1_at	<i>ndufa6</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6</i>	Dr.78619	555606	1255.1	P	952.2	P	-0.5	D
Dr.25160.1.S1_at	<i>mt2</i>	<i>metallothionein 2</i>	Dr.18420	393317	725.1	P	479.7	P	-0.5	D



Table 23 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.18420.1.S1_at	<i>zgc:63938</i>	<i>zgc:63938</i>	Dr.75625	140744	678.4	P	474.7	P	-0.5	D
Dr.5122.1.S1_at	<i>zgc:77366</i>	<i>zgc:77366</i>	Dr.7751	393943	3239.4	P	2311.5	P	-0.5	D
Dr.10292.1.S1_at	<i>rbp4l</i>	<i>retinol binding protein 4, like</i>	Dr.118268	324754	753.8	P	617.1	P	-0.5	D
Dr.3159.1.A1_at	<i>zgc:101616</i>	<i>zgc:101616</i>	Dr.76722	563544	359.4	P	238.9	P	-0.5	D
Dr.11240.1.A1_at	<i>inaa</i>	<i>internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a</i>	Dr.84945	373083	205.9	P	154.5	P	-0.5	D
Dr.14362.1.S1_at	<i>zgc:114172</i>	<i>zgc:114172</i>	Dr.83372	541328	1121.7	P	836.9	P	-0.5	D
Dr.3169.1.A1_at	<i>gemin4</i>	<i>gem (nuclear organelle) associated protein 4</i>	Dr.17624	678652	384.9	P	292.8	P	-0.5	D
Dr.24497.2.S1_a_at	<i>wu:fb09b10</i>	<i>wu:fb09b10</i>	Dr.76719	406642	250.8	P	197.2	P	-0.5	D
Dr.16716.1.S1_at	<i>dynll2a</i>	<i>dynein, light chain, LC8-type 2a</i>	Dr.75559	323529	585.7	P	361.4	P	-0.5	D
Dr.2784.1.A1_at	<i>slc25a20</i>	<i>solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20</i>	Dr.82634	555251	826.4	P	666.5	P	-0.5	D
Dr.17624.2.A1_at	<i>zgc:136817</i>	<i>zgc:136817</i>	Dr.115943	570565	565.1	P	358.2	P	-0.5	D
Dr.15690.2.S1_a_at	<i>sltm</i>	<i>SAFB-like, transcription modulator</i>	Dr.334	30501	204.8	P	126.3	P	-0.5	D
Dr.16727.1.A1_at	<i>LOC570565</i>	<i>Similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17</i>	Dr.2784	393833	724.8	P	606.4	P	-0.5	D
Dr.19274.1.S1_at	<i>ddx19</i>	<i>DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 19 (DBP5 homolog, yeast)</i>	---	100332785	1267.3	P	1146.2	P	-0.4	D
Dr.12573.1.S1_at	<i>sox32</i>	<i>SRY-box containing gene 32</i>	Dr.133216	116990	1272.8	P	915.1	P	-0.4	D
Dr.226.1.S1_at	<i>hex31</i>	<i>homeo box (expressed in ES cells) 1</i>	Dr.96025	406783	1420.1	P	943.8	P	-0.4	D
Dr.6884.1.S1_at	<i>zgc:55813</i>	<i>zgc:55813</i>	Dr.76942	403060	3531.1	P	3254.3	P	-0.4	D
Dr.5040.1.S1_at	<i>cyb5a</i>	<i>cytochrome b5 type A (microsomal)</i>	Dr.81064	406710	1758.0	P	994.4	P	-0.4	D
Dr.9532.1.S1_at	<i>rhhg</i>	<i>Rhesus blood group, B glycoprotein</i>	Dr.23039	---	73.1	P	38.7	P	-0.4	D
Dr.19560.1.S2_at	<i>insig1</i>	<i>insulin induced gene 1</i>	Dr.107930	792693	80.6	P	76.9	P	-0.4	D
Dr.24822.1.S1_at	<i>zgc:56457</i>	<i>zgc:56457</i>	Dr.9070	406775	259.2	P	189.1	P	-0.4	D
Dr.3804.2.A1_a_at	<i>atp6v0a1b /// LOC100147923 /// zgc:55891</i>	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a isoform 1b /// T-cell immune regulator 1-like /// zgc:55891</i>	Dr.32560	503737	434.6	P	332.2	P	-0.4	D
Dr.9876.1.S1_at	<i>gngt2a</i>	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2a</i>	Dr.43294	550494	310.8	P	265.4	P	-0.4	D
Dr.25555.1.A1_at	<i>LOC799290</i>	<i>myelin basic protein-like</i>	Dr.21399	266794	681.1	P	472.3	P	-0.4	D
Dr.15383.1.A1_at	<i>LOC100332785</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 38-like</i>	Dr.80110	399488	220.0	P	181.0	P	-0.4	D
Dr.6183.1.A1_at	<i>stmn4</i>	<i>Stathmin-like 4</i>	---	100332524	201.1	P	135.0	P	-0.4	D
Dr.10199.1.S1_at	<i>tob1b</i>	<i>transducer of ERBB2, 1b</i>	Dr.79186	777760	1473.8	P	1277.5	P	-0.4	D
Dr.11409.1.A1_at	<i>vrk3</i>	<i>vaccinia related kinase 3</i>	Dr.226	30620	140.8	P	85.9	P	-0.4	D
Dr.13985.1.A1_at	<i>zgc:152948</i>	<i>zgc:152948</i>	Dr.5040	406409	285.8	P	210.6	P	-0.4	D

Table 23 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.23549.1.A1_at	<i>sdprb</i>	<i>serum deprivation response b</i>	Dr.10199	406245	1219.4	P	1094.4	P	-0.4	D
Dr.98.1.A1_at	<i>pcnt1</i>	<i>pericentrin 1</i>	Dr.25381	563325	1100.8	P	790.0	P	-0.4	D
Dr.13132.1.A1_at	<i>akr1a1b</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member A1b (aldehyde reductase)</i>	Dr.118521	337596	472.6	P	381.3	P	-0.4	D
Dr.7841.1.A1_at	<i>upf1</i>	<i>upf1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)</i>	Dr.83439	100124611	2110.7	P	1531.1	P	-0.4	D
Dr.24771.1.A1_at	<i>smc1al</i>	<i>structural maintenance of chromosomes 1A, like</i>	Dr.115835	334189	531.1	P	405.8	P	-0.4	D
Dr.23039.1.S1_at	---	---	---	321776	1039.7	P	748.9	P	-0.4	D
Dr.13688.1.S1_at	<i>LOC792693</i>	<i>CD3E antigen, epsilon polypeptide associated protein-like</i>	Dr.85135	393260	832.8	P	590.3	P	-0.4	D
Dr.9070.1.A1_at	<i>srsf6a</i>	<i>serine/arginine-rich splicing factor 6a</i>	Dr.3804	100147923 /// 406342 /// 553691	839.5	P	675.6	P	-0.4	D
Dr.7769.1.S1_at	<i>dpp7</i>	<i>dipeptidyl-peptidase 7</i>	Dr.91161	353362	660.8	P	602.1	P	-0.4	D
Dr.15151.1.S1_at	<i>esd</i>	<i>esterase D/formylglutathione hydrolase</i>	Dr.76566	541443	236.5	P	143.3	P	-0.4	D
Dr.10051.1.A1_at	<i>ccng2</i>	<i>cyclin G2</i>	Dr.13985	767666	406.8	P	328.8	P	-0.4	D
Dr.5995.1.A1_at	<i>LOC100332524</i>	<i>Major facilitator superfamily domain-containing protein 1-like</i>	Dr.19203	335655	4661.3	P	3607.2	P	-0.4	D
Dr.13282.1.S1_at	<i>gas1b</i>	<i>growth arrest-specific 1b</i>	Dr.155349	447853	842.3	P	574.2	P	-0.4	D
Dr.7269.1.A1_at	<i>anxa4</i>	<i>annexin A4</i>	Dr.107565	447845	242.5	P	194.9	P	-0.4	D
Dr.25381.1.S1_at	<i>si:dkey-92i17.2</i>	<i>si:dkey-92i17.2</i>	Dr.98	445231	831.8	P	594.3	P	-0.4	D
Dr.13813.1.A1_at	<i>zgc:171663</i>	<i>zgc:171663</i>	Dr.83969	799805	2308.9	P	1699.5	P	-0.4	D
Dr.4128.1.A1_at	<i>wu:fb34c08</i>	<i>wu:fb34c08</i>	Dr.116877	192339	559.2	P	407.1	P	-0.4	D
Dr.20429.2.S1_a_at	<i>dlgap5</i>	<i>discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5</i>	Dr.155071	799290	1130.5	P	902.7	P	-0.4	D
Dr.13796.2.S1_x_at	<i>upf3b</i>	<i>UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)</i>	Dr.13796	393929	176.8	P	158.6	P	-0.4	D
Dr.3448.1.S1_at	<i>klf2a</i>	<i>Kruppel-like factor 2a</i>	Dr.20969	353313	1105.4	P	874.2	P	-0.3	D
Dr.10711.1.S2_at	<i>ctbp1</i>	<i>C-terminal binding protein 1</i>	Dr.108126	393652	386.7	P	334.6	P	-0.3	D
Dr.18312.1.S1_at	<i>u2af1</i>	<i>U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>	Dr.132711	325449	4776.6	P	3918.4	P	-0.3	D
Dr.8064.1.S1_at	<i>drl</i>	<i>draculin</i>	Dr.76354	564072	331.8	P	291.0	P	-0.3	D
Dr.284.2.A1_a_at	<i>otx1b</i> /// <i>wu:fc92e03</i>	<i>orthodenticle homolog 1b</i> /// <i>wu:fc92e03</i>	Dr.132769	100334002 /// 334099	947.2	P	778.1	P	-0.3	D
Dr.555.1.S1_at	<i>neurog1</i>	<i>neurogenin 1</i>	Dr.11051	---	1433.7	P	1086.4	P	-0.3	D
Dr.463.1.S1_at	<i>her5</i>	<i>hairy-related 5</i>	Dr.36545	619246	923.1	P	627.3	P	-0.3	D
Dr.5756.1.S1_at	<i>hoxb5b</i>	<i>homeo box B5b</i>	---	322812	410.8	P	280.6	P	-0.3	D

Table 23 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.728.1.S1_x_at	<i>dopey2</i> /// <i>LOC100332484</i> /// <i>LOC100332551</i> /// <i>LOC100332822</i> /// <i>LOC100333493</i> /// <i>wu:fi09b08</i> /// <i>zgc:165539</i> /// <i>zgc:173770</i>	<i>dopey family member 2</i> /// <i>dopey family member 2-like</i> /// <i>hypothetical protein LOC100332551</i> /// <i>hypothetical protein</i> <i>LOC100332822</i> /// <i>dopey family member 2-like</i> /// <i>wu:fi09b08</i> /// <i>zgc:165539</i> /// <i>zgc:173770</i>	Dr.81561	---	1139.4	P	981.6	P	-0.3	D
Dr.2953.1.S1_at	<i>rasl11b</i>	<i>RAS-like, family 11, member B</i>	Dr.86275	555786	276.1	P	207.1	P	-0.3	D
Dr.1543.1.S1_at	<i>dnajc3</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</i>	Dr.75373	560622	376.2	P	272.5	P	-0.3	D
Dr.19893.1.S1_at	<i>znf503</i>	<i>zinc finger protein 503</i>	Dr.20346	494084	545.5	P	458.1	P	-0.3	D
Dr.10168.2.S1_at	<i>maf</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene</i> <i>homolog</i>	Dr.151042	403012	368.3	P	328.4	P	-0.3	D
Dr.20969.1.S1_at	<i>foxi1</i>	<i>forkhead box II</i>	Dr.75783	58052	1013.2	P	836.9	P	-0.3	D
DrAffx.1.53.S1_at	<i>zgc:65749</i>	<i>zgc:65749</i>	Dr.79983	563054	1389.3	P	955.3	P	-0.3	D
Dr.18233.1.A1_at	<i>LOC325449</i>	<i>kinesin family member 20A</i>	Dr.45557	553206	305.0	P	285.8	P	-0.3	D
Dr.15380.1.S1_at	<i>LOC100334002</i> /// <i>naa15b</i>	<i>NMDA receptor-regulated gene 1b-like</i> /// <i>N(alpha)-</i> <i>acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit b</i>	Dr.29173	117508	340.3	P	302.1	P	-0.3	D
Dr.11051.1.A1_at	---	---	Dr.3350	492495	1164.0	P	999.4	P	-0.3	D
Dr.7660.1.A1_at	<i>pacsin1b</i>	<i>protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1b</i>	Dr.76269	406304	1110.2	P	870.0	P	-0.3	D
Dr.20295.1.A1_at	<i>wu:fb73h08</i>	<i>wu:fb73h08</i>	Dr.155356	65229	303.5	P	295.7	P	-0.3	D
Dr.25440.1.A1_x_at	---	---	Dr.78050	393762	108.2	P	96.9	P	-0.3	D
Dr.17478.1.A1_at	<i>npm2</i>	<i>nucleoplasmn 2</i>	Dr.18312	192328	654.4	P	593.0	P	-0.3	D
Dr.20346.1.S1_at	<i>stk35l</i>	<i>serine/threonine kinase 35, like</i>	Dr.81311	30167	2430.6	P	2161.6	P	-0.3	D
Dr.25778.1.S1_at	<i>caprin1a</i>	<i>cell cycle associated protein 1a</i>	Dr.106104	30500 /// 560857	590.4	P	312.2	P	-0.3	D
Dr.14266.1.A1_at	<i>ankrd52</i>	<i>ankyrin repeat domain 52</i>	Dr.85498	751656	680.9	P	467.7	P	-0.3	D
Dr.15889.1.S1_at	<i>crep</i>	<i>calcitonin gene-related peptide-receptor component protein</i>	Dr.75780	30239	451.8	P	343.0	P	-0.3	D
Dr.4202.1.S1_at	<i>ppp1r7</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7</i>	Dr.82842	449546	373.0	P	265.5	P	-0.3	D
Dr.26404.3.S1_at	<i>LOC564072</i>	<i>Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2-like</i>	Dr.34117	445090	1339.1	P	1141.2	P	-0.3	D
Dr.14247.1.S1_at	<i>wu:fd12d03</i>	<i>wu:fd12d03</i>	Dr.75071	30285	888.7	P	742.8	P	-0.3	D

Table 23 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.4431.2.S1_at	<i>bub3</i>	<i>BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)</i>	Dr.47605	100124606 /// 100332484 /// 100332551 /// 100332822 /// 100333493 /// 327419 /// 393582 /// 564373	643.0	P	469.5	P	-0.3	D
Dr.6268.1.A1_at	<i>wu:fe11c03</i>	<i>wu:fe11c03</i>	Dr.51739	393109	402.6	P	410.6	P	-0.3	D
Dr.3350.2.A1_at	<i>slu7</i>	<i>SLU7 splicing factor homolog (S. cerevisiae)</i>	Dr.77134	322544	461.7	P	450.7	P	-0.3	D
Dr.1378.2.S1_a_at	<i>gadd45ba</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, beta a</i>	Dr.76971	560323	417.8	P	392.4	P	-0.3	D
Dr.11351.1.A1_at	<i>zgc:73324</i>	<i>zgc:73324</i>	Dr.19893	324913	164.5	P	123.3	P	-0.3	D
Dr.11062.1.A1_at	<i>ric8a</i>	<i>resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog A</i>	Dr.120867	114467	530.6	P	372.5	P	-0.3	D
Dr.22964.2.A1_at	---	---	---	---	282.7	P	212.3	P	-0.3	D
Dr.8293.1.S1_at	<i>gata6</i>	<i>GATA-binding protein 6</i>	---	100332871	616.6	P	634.7	P	-0.2	D
Dr.5129.1.S1_at	<i>sesn3</i>	<i>sestrin 3</i>	Dr.14007	402896	6886.6	P	5775.6	P	-0.2	D
Dr.14007.1.S1_at	<i>snrpb2</i>	<i>small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B2</i>	Dr.105819	792544	2589.3	P	2151.6	P	-0.2	D
Dr.25653.1.A1_at	<i>zic3</i>	<i>zic family member 3 heterotaxy 1 (odd-paired homolog, Drosophila)</i>	Dr.82325	327618	1591.0	P	1121.8	P	-0.2	D
Dr.6366.1.A1_at	<i>prpf3</i>	<i>PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)</i>	Dr.5129	406840	1113.6	P	885.0	P	-0.2	D
Dr.2985.1.A1_at	<i>zgc:175096</i>	<i>zgc:175096</i>	Dr.78356	58076	526.9	P	418.3	P	-0.2	D
Dr.16694.1.S1_at	<i>si:dkey-67c22.2</i>	<i>si:dkey-67c22.2</i>	Dr.31044	368263	2126.9	P	1739.9	P	-0.2	D
Dr.12706.2.S1_at	<i>si:dkey-21n12.1</i>	<i>si:dkey-21n12.1</i>	Dr.2985	563587	1108.2	P	962.8	P	-0.2	D
Dr.16099.1.S1_at	---	---	Dr.123444	---	45.2	P	39.6	P	-0.2	D
Dr.9071.2.S1_at	<i>LOC100332871</i>	<i>protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor)-like</i>	Dr.75242	403072	1190.0	P	911.6	P	-0.2	D

**Table 24. マイクロアレイ解析で発現上昇が見出された遺伝子 (37°C, 30 min., 2 hph)**

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.1691.9.S1_at	<i>he1b</i>	<i>hatching enzyme 1b</i>	Dr.76538	407971	1106.8	P	2985.3	P	1.4	I
Dr.8554.1.A1_at	---	---	---	---	83.7	P	228.7	P	1.0	I
Dr.24241.1.S1_at	<i>mdkb</i>	<i>midkine-related growth factor b</i>	Dr.104705	65231	1192.7	P	2266.0	P	0.9	I
Dr.4932.1.S1_at	<i>anxa4</i> /// <i>LOC792474</i>	<i>annexin A4</i> /// <i>annexin A4-like</i>	Dr.77932	553317	136.3	P	204.0	P	0.9	I
Dr.1302.1.A1_at	<i>zgc:63831</i>	<i>zgc:63831</i>	Dr.1302	336746	117.7	P	177.7	P	0.9	I
Dr.23150.1.A1_at	<i>si:ch211-173p18.3</i>	<i>si:ch211-173p18.3</i>	Dr.76727	353362 /// <i>792474</i>	43.7	P	95.1	P	0.9	I
Dr.7417.1.S1_at	<i>sh3bp5</i>	<i>SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)</i>	Dr.14214	553615	94.4	P	143.4	P	0.8	I
Dr.11609.1.S1_at	<i>LOC402847</i>	<i>hypothetical protein LOC402847</i>	Dr.79676	402847	107.9	P	188.9	P	0.8	I
Dr.9852.1.A1_at	<i>LOC100332548</i>	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID-like</i>	Dr.85607	449797	156.6	P	281.4	P	0.8	I
Dr.10624.1.S1_at	<i>LOC100329896</i>	<i>peroxiredoxin-1-like</i>	---	100332548	341.2	P	634.3	P	0.8	I
Dr.20163.1.S1_at	<i>zap70</i>	<i>zeta-chain (TCR) associated protein kinase</i>	Dr.150718	406767	161.3	P	280.6	P	0.8	I
Dr.18524.1.A1_at	<i>tspan13b</i>	<i>tetraspanin 13b</i>	---	100329896	109.6	P	162.2	P	0.8	I
Dr.8136.1.S1_at	<i>pth2r</i>	<i>parathyroid hormone 2 receptor</i>	Dr.20571	322626	152.4	P	268.9	P	0.7	I
Dr.3536.1.A1_at	<i>col11a1a</i>	<i>collagen, type XI, alpha 1a</i>	Dr.82912	432383	78.6	P	140.3	P	0.7	I
Dr.3343.1.A1_x_at	<i>cops4</i>	<i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis)</i>	Dr.3536	565402	65.5	P	126.0	P	0.7	I
Dr.11219.1.A1_at	<i>mrps33</i>	<i>mitochondrial ribosomal protein S33</i>	---	326754	133.0	P	205.0	P	0.7	I
Dr.6885.1.A1_at	<i>wu:fe14d06</i>	<i>wu:fe14d06</i>	Dr.77245	325592	754.9	P	1213.2	P	0.7	I
Dr.20571.1.S1_at	<i>hgd17b12b</i>	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12b</i>	Dr.8136	30650	61.6	P	103.2	P	0.7	I
Dr.1053.1.A1_at	<i>eef2a.1</i>	<i>eukaryotic translation elongation factor 2a, tandem duplicate 1</i>	Dr.1053	792182	238.9	P	304.3	P	0.7	I
Dr.17441.1.S1_at	<i>zgc:56288</i>	<i>zgc:56288</i>	---	324982	405.4	P	586.2	P	0.6	I
Dr.6509.1.S1_at	<i>pdip5</i>	<i>protein disulfide isomerase-related protein (provisional)</i>	Dr.76743	445157	636.8	P	865.5	P	0.6	I
Dr.18112.1.S1_at	<i>zgc:101072</i>	<i>zgc:101072</i>	---	325514	380.4	P	437.7	P	0.6	I
Dr.2087.1.A1_at	<i>wu:fc84b06</i>	<i>wu:fc84b06</i>	Dr.82617	393783	192.4	P	318.2	P	0.6	I
Dr.19567.1.S1_at	<i>zgc:73377</i>	<i>zgc:73377</i>	Dr.18112	794796	166.0	P	252.0	P	0.6	I
Dr.15828.1.A1_at	<i>LOC556447</i>	<i>polyprotein-like</i>	Dr.76967	322160	135.0	P	210.8	P	0.6	I
Dr.14834.1.A1_at	<i>zgc:101136</i>	<i>zgc:101136</i>	Dr.85478	393192	164.0	P	372.3	P	0.6	I
Dr.25331.2.A1_at	<i>pzp</i>	<i>pregnancy-zone protein</i>	Dr.80637	386787	311.7	P	593.2	P	0.6	I
Dr.22498.1.A1_at	<i>itga5</i>	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	---	556447	205.1	P	253.4	P	0.6	I
Dr.3762.1.S1_at	<i>slc35e1</i>	<i>solute carrier family 35, member E1</i>	Dr.78150	494100	313.8	P	371.6	P	0.5	I
Dr.195.1.S2_at	<i>ck2a1</i>	<i>casein kinase 2 alpha 1</i>	---	---	824.5	P	964.8	P	0.5	I
Dr.19947.1.S1_at	<i>lmbr1l</i>	<i>limb region 1 like</i>	Dr.151162	---	438.9	P	620.3	P	0.5	I

Table 24 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.24982.1.S1_at	<i>zgc:56585</i>	<i>zgc:56585</i>	Dr.83404	378726	375.2	P	625.2	P	0.5	I
Dr.16655.1.S1_at	<i>zgc:56518</i>	<i>zgc:56518</i>	Dr.81710	541344	202.0	P	267.4	P	0.5	I
Dr.15857.1.A1_at	<i>csrp1a</i>	<i>cysteine and glycine-rich protein 1a</i>	Dr.119789	559659	348.6	P	489.0	P	0.5	I
Dr.152.1.A1_at	<i>xirp1</i>	<i>Xin actin-binding repeat containing 1</i>	Dr.78105	406736	162.4	P	185.0	P	0.5	I
Dr.10624.2.S1_a_at	<i>zgc:110343</i>	<i>zgc:110343</i>	Dr.123156	---	565.0	P	778.2	P	0.5	I
Dr.13616.1.A1_at	---	---	Dr.24982	393297	583.7	P	849.4	P	0.5	I
Dr.14123.1.A1_at	<i>atp5ia</i>	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e, duplicate a</i>	Dr.19947	321314	597.8	P	935.5	P	0.5	I
Dr.25398.2.A1_at	---	---	Dr.75097	30502	287.7	P	461.5	P	0.5	I
Dr.18470.1.A1_at	---	---	Dr.121258	---	228.7	P	332.2	P	0.5	I
Dr.25387.1.A1_at	---	---	Dr.152	497637	98.6	P	131.4	P	0.5	I
Dr.7118.2.A1_a_at	<i>obfc2aa</i>	<i>oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2Aa</i>	Dr.116889	406347	256.8	P	321.4	P	0.5	I
AFFX-CreX-3_at	---	---	Dr.86220	325724	18378.2	P	24563.4	P	0.4	I
Dr.23788.1.S1_at	<i>gstp1</i>	<i>glutathione S-transferase pi</i>	---	324018	3199.0	P	4028.1	P	0.4	I
Dr.6798.1.S1_at	<i>cxcr4b</i>	<i>chemokine (C-X-C motif), receptor 4b</i>	---	324898	155.2	P	232.4	P	0.4	I
Dr.8093.1.S1_at	<i>par1</i>	<i>paraxis</i>	Dr.107449	399546	639.0	P	855.2	P	0.4	I
Dr.20373.1.S2_at	<i>mdka</i>	<i>midkine-related growth factor</i>	Dr.75120	386634	447.9	P	606.0	P	0.4	I
Dr.5170.1.S1_at	<i>etfa</i>	<i>electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide</i>	Dr.23802	399481	1142.9	P	1427.0	P	0.4	I
Dr.20067.1.S1_at	<i>calrl</i>	<i>calreticulin like</i>	Dr.118394	394120	157.4	P	190.2	P	0.4	I
Dr.3685.1.S1_at	<i>ostc</i>	<i>oligosaccharyltransferase complex subunit</i>	Dr.18867	553507	1973.6	P	2609.7	P	0.4	I
Dr.1410.1.S1_at	<i>prrx1a</i>	<i>paired related homeobox 1a</i>	Dr.2784	393833	150.7	P	210.4	P	0.4	I
Dr.17355.1.S1_at	<i>nudt3a</i>	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3a</i>	Dr.77839	323559	89.7	P	135.6	P	0.4	I
Dr.23802.1.S1_at	<i>aldh9a1b</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1b</i>	Dr.83404	378726	316.5	P	366.8	P	0.4	I
Dr.24841.2.S1_at	<i>eif4a1a</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1A</i>	---	449668	1638.4	P	2502.2	P	0.4	I
Dr.9446.1.A1_a_at	<i>pxn</i>	<i>paxillin</i>	---	368642	458.5	P	595.8	P	0.4	I
Dr.11974.1.A1_at	<i>wu:fc47b11</i>	<i>wu:fc47b11</i>	Dr.32622	406431	302.9	P	355.3	P	0.4	I
Dr.19556.1.A1_at	<i>wu:fc16h11</i>	<i>wu:fc16h11</i>	Dr.114331	406308	1534.4	P	2637.4	P	0.4	I
Dr.10624.2.S1_at	<i>zgc:110343</i>	<i>zgc:110343</i>	Dr.3685	393239	365.5	P	606.5	P	0.4	I
Dr.18416.1.A1_at	<i>selenbp1</i>	<i>selenium binding protein 1</i>	Dr.114282	100135062	186.4	P	265.3	P	0.4	I
Dr.7717.1.S1_at	<i>csf2rb</i>	<i>colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)</i>	Dr.105519	321315	482.7	P	682.4	P	0.4	I
Dr.7717.2.A1_at	<i>grb2</i>	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	Dr.31448	30277	689.6	P	962.4	P	0.4	I
Dr.25185.2.S1_a_at	<i>si:busm1-79m10.1</i>	<i>si:busm1-79m10.1</i>	Dr.18416	393542	1650.5	P	2225.8	P	0.4	I
Dr.25185.1.S1_s_at	<i>im:6791170</i>	<i>im:6791170</i>	Dr.81253	30159	1359.4	P	1837.2	P	0.4	I

Table 24 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.15857.2.S1_at	<i>csrp1a</i>	<i>cysteine and glycine-rich protein 1a</i>	Dr.75485	114447	699.1	P	1008.9	P	0.4	I
Dr.3715.1.A1_at	<i>grcc10</i>	<i>gene rich cluster, C10 gene</i>	Dr.46820	79381	514.7	P	724.0	P	0.4	I
Dr.2784.1.A1_at	<i>slc25a20</i>	<i>solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20</i>	Dr.81710	541344	943.7	P	1288.9	P	0.4	I
Dr.18867.1.S1_at	<i>npm4</i>	<i>nucleophosmin/nucleoplasmin, 4</i>	---	---	635.9	P	637.1	P	0.4	I
Dr.8282.2.S1_a_at	<i>irx3a</i>	<i>iroquois homeobox protein 3a</i>	Dr.11690	386628	574.3	P	654.1	P	0.3	I
Dr.5479.1.S1_at	<i>rbp4</i>	<i>retinol binding protein 4, plasma</i>	---	449668	789.0	P	1045.6	P	0.3	I
Dr.574.1.S1_at	<i>dlb</i>	<i>deltaB</i>	Dr.75997	325557	366.2	P	475.5	P	0.3	I
DrAffx.2.5.S1_s_at	<i>dnd</i>	<i>dead end</i>	Dr.26907	373074	148.9	P	171.3	P	0.3	I
Dr.1260.1.S1_at	<i>anxa2a</i>	<i>annexin A2a</i>	---	324350	701.8	P	890.3	P	0.3	I
Dr.11690.1.S1_at	<i>ntd5</i>	<i>ntl-dependent gene 5</i>	Dr.76879	445126	1497.1	P	2144.2	P	0.3	I
Dr.25459.1.A1_at	<i>ca8</i>	<i>carbonic anhydrase VIII</i>	Dr.574	30141	208.1	P	264.2	P	0.3	I
Dr.4119.2.S1_at	<i>hoxd4a</i>	<i>Homeo box D4a</i>	Dr.104992	100004654	309.8	P	346.5	P	0.3	I
Dr.25559.1.S1_at	<i>sb:cb166</i>	<i>sb:cb166</i>	Dr.1400	30077	3443.8	P	4641.6	P	0.3	I
Dr.21628.1.A1_at	<i>wu:fc26d05</i>	<i>wu:fc26d05</i>	Dr.8282	30520	297.8	P	417.9	P	0.3	I
Dr.23890.1.S1_at	<i>fkbp9</i>	<i>FK506 binding protein 9</i>	Dr.3168	324743	1072.7	P	1274.3	P	0.3	I
Dr.19929.1.A1_at	<i>wu:fb50a04</i>	<i>wu:fb50a04</i>	---	321132	2898.2	P	3592.3	P	0.3	I
Dr.3168.2.A1_a_at	<i>snupn</i>	<i>snurportin 1</i>	Dr.75800	30329	419.4	P	512.5	P	0.3	I
Dr.25185.1.S1_x_at	<i>im:6791170</i>	<i>im:6791170</i>	Dr.13836	550233	1376.2	P	1652.8	P	0.3	I
Dr.17101.1.S1_at	<i>klhdc10</i>	<i>kelch domain containing 10</i>	Dr.75936	558711	76.5	P	76.7	P	0.2	I
Dr.24921.1.S1_at	<i>gpx4b</i>	<i>glutathione peroxidase 4b</i>	Dr.24921	352929	2515.6	P	3113.0	P	0.2	I
Dr.25598.1.A1_at	<i>h2afy2</i>	<i>H2A histone family, member Y2</i>	Dr.78071	393231	1821.1	P	2227.7	P	0.2	I
Dr.2621.1.A1_at	<i>aup1</i>	<i>ancient ubiquitous protein 1</i>	Dr.2621	324654	1032.2	P	1157.1	P	0.2	I

Table 25. マイクロアレイ解析で発現低下が見出された遺伝子 (37°C, 30 min., 2 hph)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.16392.1.A1_at	<i>c6</i> /// <i>LOC100331946</i> /// <i>LOC100332091</i>	<i>complement component 6</i> /// <i>complement component 6-like</i> /// <i>complement component 6-like</i>	Dr.16392	100331946 /// 100332091 /// 393611	149.4	P	6.9	A	-4.9	D
Dr.9457.1.A1_at	<i>egl3</i>	<i>egl nine homolog 3 (C. elegans)</i>	Dr.9457	406602	672.4	P	178.4	P	-2.0	D
Dr.12573.1.S1_at	<i>sox32</i>	<i>SRY-box containing gene 32</i>	Dr.133216	116990	329.7	P	103.5	P	-1.9	D
Dr.20054.1.S1_at	<i>mid1ip1a</i>	<i>MID1 interacting protein 1a</i>	Dr.75062	30600	4051.1	P	1122.4	P	-1.8	D
Dr.3029.1.A1_at	<i>ugt1a1</i> /// <i>ugt1a2</i> /// <i>ugt1a4</i> /// <i>ugt1a5</i> /// <i>ugt1a6</i> /// <i>ugt1a7</i> /// <i>ugt1ab</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide a1</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A4</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A5</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7</i> /// <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family a, b</i>	Dr.39930	100379286 /// 100384891 /// 100384896 /// 100384897 /// 100384901 /// 406731 /// 641488	41.2	P	12.3	A	-1.8	D
Dr.3171.1.S1_at	<i>stard10</i>	<i>START domain containing 10</i>	Dr.78104	100001416	122.4	P	40.4	P	-1.6	D
Dr.26445.1.S1_at	<i>elovl7b</i>	<i>ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast) b</i>	Dr.78825	327274	720.8	P	257.1	P	-1.4	D
Dr.16277.1.A1_at	---	---	---	---	72.9	P	22.3	A	-1.4	D
Dr.10314.1.S1_a_at	<i>mmp13a</i>	<i>matrix metalloproteinase 13a</i>	Dr.76707	560869	144.2	P	34.0	A	-1.3	D
Dr.1909.1.S1_at	<i>elf3</i>	<i>E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )</i>	Dr.81475	387293	115.3	P	31.7	A	-1.3	D
Dr.19562.1.S1_at	---	---	Dr.88294	---	538.0	P	198.9	P	-1.2	D
Dr.12663.1.A1_at	<i>pogza</i>	<i>pogo transposable element with ZNF domain a</i>	Dr.7577	563536	246.9	P	102.3	P	-1.2	D
Dr.23039.1.S1_at	---	---	---	323972	534.5	P	194.8	P	-1.2	D
Dr.10649.1.A1_at	<i>wu:fc15g11</i>	<i>wu:fc15g11</i>	Dr.23039	---	68.8	P	48.5	A	-1.2	D
Dr.8587.1.A2_at	<i>igfbp1a</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein 1a</i>	Dr.76315	317638	213.7	P	69.9	P	-1.1	D
Dr.10326.1.S1_at	<i>junb</i>	<i>jun B proto-oncogene</i>	Dr.10326	407086	218.4	P	134.4	P	-1.1	D
Dr.13531.1.A1_at	<i>tmem35</i>	<i>transmembrane protein 35</i>	Dr.76123	393444	207.0	P	111.0	P	-1.1	D
Dr.13671.1.A1_at	<i>macc1</i>	<i>metastasis associated in colon cancer 1</i>	Dr.43215	791920	123.5	P	65.1	P	-1.1	D
Dr.12209.1.S1_at	<i>gpt2</i>	<i>glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2</i>	Dr.82787	799963	55.4	P	37.4	A	-1.1	D



Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.17491.2.S1_at	<i>pygmb</i>	<i>phosphorylase, glycogen (muscle) b</i>	---	558777	162.8	P	70.7	A	-1.1	D
Dr.25630.1.S1_at	---	---	Dr.86620	---	98.4	P	68.8	P	-1.1	D
Dr.12596.1.S1_at	<i>cldnc</i>	<i>claudin c</i>	Dr.79060	797943	318.2	P	171.8	P	-1.0	D
Dr.12654.1.S1_at	<i>elovl6l</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids like</i>	Dr.79367	100150288	250.3	P	113.7	P	-1.0	D
Dr.923.1.A1_at	<i>sqstm1</i>	<i>sequestosome 1</i>	Dr.76246	406452	292.5	P	196.5	P	-1.0	D
Dr.5025.1.S1_at	---	---	Dr.82669	393393	619.4	P	319.0	P	-1.0	D
Dr.21489.1.A1_at	<i>f13a1</i>	<i>Coagulation factor XIII, A1 polypeptide</i>	Dr.16206	561287	49.0	P	23.1	A	-1.0	D
Dr.12833.1.A1_at	<i>zgc:64213</i>	<i>zgc:64213</i>	Dr.77730	---	307.6	P	163.1	P	-1.0	D
Dr.4654.1.A1_at	<i>zgc:162126</i>	<i>zgc:162126</i>	Dr.155394	81582	565.1	P	272.5	P	-1.0	D
Dr.13972.1.S1_at	<i>zgc:64114</i>	<i>zgc:64114</i>	Dr.45557	553206	1133.0	P	501.4	P	-0.9	D
Dr.10879.1.A1_at	<i>zgc:110251</i>	<i>zgc:110251</i>	Dr.79060	797943	1014.5	P	638.6	P	-0.9	D
Dr.14266.1.A1_at	<i>ankrd52</i>	<i>ankyrin repeat domain 52</i>	---	---	155.4	P	63.1	M	-0.9	D
Dr.1121.1.A1_at	<i>wu:fa99e04</i>	<i>wu:fa99e04</i>	---	---	143.1	P	89.3	P	-0.9	D
Dr.6105.1.A1_at	<i>si:dkey-147f3.4</i>	<i>si:dkey-147f3.4</i>	Dr.6752	768304	1068.7	P	473.3	P	-0.9	D
Dr.13239.1.S1_at	<i>zgc:91960</i>	<i>zgc:91960</i>	Dr.84511	554121	69.4	P	29.6	P	-0.9	D
Dr.4654.2.S1_at	<i>zgc:162126</i>	<i>zgc:162126</i>	Dr.79030	567338	224.2	P	117.8	P	-0.9	D
Dr.3896.1.A1_at	<i>zgc:162591</i>	<i>zgc:162591</i>	Dr.133920	553461	66.0	P	50.1	M	-0.9	D
Dr.8747.1.A1_at	---	---	Dr.80118	553602	279.0	P	152.5	P	-0.9	D
Dr.13663.1.A1_at	<i>zgc:112399</i>	<i>zgc:112399</i>	Dr.81822	436937	43.8	P	11.2	A	-0.9	D
Dr.17051.1.A1_a_at	<i>atp2b4</i>	<i>ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4</i>	Dr.82488	378866	142.1	P	53.4	P	-0.9	D
Dr.14615.1.A1_at	---	---	Dr.1121	797357	33.1	P	11.8	A	-0.9	D
Dr.4212.1.S1_at	<i>ldha</i>	<i>lactate dehydrogenase A4</i>	Dr.4212	30496	239.6	P	135.5	P	-0.8	D
Dr.3466.1.A1_at	<i>lpcat4</i>	<i>lysophosphatidylcholine acyltransferase 4</i>	---	---	575.4	P	265.9	P	-0.8	D
Dr.13751.1.S1_at	<i>si:ch211-202f5.3</i>	<i>si:ch211-202f5.3</i>	Dr.79060	797943	213.5	P	128.4	P	-0.8	D
Dr.4078.1.A1_at	<i>wu:fb06h03</i>	<i>wu:fb06h03</i>	---	562190	853.1	P	519.8	P	-0.8	D
Dr.13145.1.A1_at	---	---	Dr.150431	327566	978.4	P	599.5	P	-0.8	D
Dr.14617.1.S1_at	<i>dsc2l</i>	<i>desmocollin 2 like</i>	Dr.148675	556915	382.0	P	231.1	P	-0.8	D
Dr.1815.1.A1_at	<i>macf1</i>	<i>microtubule-actin crosslinking factor 1</i>	---	322744	190.4	P	94.6	P	-0.8	D
Dr.4654.3.S1_at	<i>zgc:162126</i>	<i>zgc:162126</i>	---	336824	198.6	P	125.9	A	-0.8	D
Dr.13320.1.A1_at	<i>vezfl</i>	<i>vascular endothelial zinc finger 1</i>	---	---	2075.4	P	1338.7	P	-0.8	D
Dr.9240.1.A1_at	---	---	---	---	396.6	P	172.1	P	-0.8	D
Dr.20284.1.A1_at	<i>wu:fb72d07</i>	<i>wu:fb72d07</i>	Dr.76256	560091	116.0	P	43.0	A	-0.8	D
Dr.23614.1.A1_at	---	---	Dr.115096	795321	177.7	P	120.8	P	-0.8	D
Dr.258.1.S1_at	<i>pou5f1</i>	<i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>	---	323130	1523.0	P	1034.3	P	-0.7	D

Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.226.1.S1_at	<i>hesx1</i>	<i>homeo box (expressed in ES cells) 1</i>	Dr.258	30333	321.2	P	152.0	P	-0.7	D
Dr.6988.1.S1_at	<i>admp</i> /// <i>LOC100333700</i>	<i>anti-dorsalizing morphogenic protein /// anti-dorsalizing morphogenic protein-like</i>	Dr.77191	406303	435.7	P	272.7	P	-0.7	D
Dr.6884.1.S1_at	<i>zgc:55813</i>	<i>zgc:55813</i>	Dr.51235	570832	2485.7	P	1514.5	P	-0.7	D
Dr.9000.1.S1_at	<i>hsd17b12a</i>	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12a</i>	Dr.226	30620	6243.4	P	4044.0	P	-0.7	D
Dr.13076.1.S1_at	<i>plekhf1</i>	<i>pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1</i>	Dr.76667	336526	543.9	P	367.4	P	-0.7	D
Dr.23942.1.S1_at	<i>b3gnt5a</i>	<i>UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5a</i>	Dr.78868	554477	570.8	P	322.3	P	-0.7	D
Dr.1835.1.S1_at	<i>hnf4a</i>	<i>hepatocyte nuclear factor 4, alpha</i>	Dr.77049	322358	148.1	P	88.1	P	-0.7	D
Dr.26381.1.A1_at	<i>tuba2</i>	<i>tubulin, alpha 2</i>	Dr.83473	---	140.9	P	79.8	P	-0.7	D
Dr.16322.1.A1_at	<i>add1</i>	<i>adducin 1 (alpha)</i>	Dr.148831	555511	1356.5	P	955.9	P	-0.7	D
Dr.7626.1.A1_at	<i>pfkfb3</i>	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3</i>	Dr.80110	399488	240.6	P	114.5	P	-0.7	D
Dr.14473.1.S1_at	---	---	Dr.80639	100333700 /// 140619	120.0	P	56.8	P	-0.7	D
Dr.3275.1.A1_at	<i>gpd1b</i>	<i>glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1b</i>	Dr.79210	325181	1179.3	P	698.4	P	-0.7	D
Dr.96.1.A1_at	<i>c7</i>	<i>complement component 7</i>	Dr.29406	327417	274.0	P	197.2	P	-0.7	D
Dr.21165.1.S1_at	<i>wu:fb82f09</i>	<i>wu:fb82f09</i>	Dr.80998	393311	249.4	P	160.0	P	-0.7	D
Dr.13481.1.S1_at	---	---	Dr.111270	100073342	86.8	P	45.1	P	-0.7	D
Dr.20531.1.S1_at	<i>oxsr1a</i>	<i>oxidative-stress responsive 1a</i>	Dr.148554	568602	288.8	P	144.1	P	-0.7	D
Dr.17772.1.A1_at	<i>zgc:165523</i>	<i>zgc:165523</i>	Dr.13481	---	187.1	P	127.1	P	-0.7	D
Dr.21590.1.A1_at	<i>gcnt4</i>	<i>glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2</i>	Dr.78782	324510	529.9	P	258.2	P	-0.7	D
Dr.5112.1.S3_at	---	---	Dr.4740	550501	264.7	P	176.0	P	-0.6	D
Dr.463.1.S1_at	<i>her5</i>	<i>hairy-related 5</i>	Dr.148902	568849	937.6	P	650.6	P	-0.6	D
Dr.20125.1.A1_at	<i>zgc:111983</i>	<i>zgc:111983</i>	Dr.75071	30285	266.7	P	197.4	P	-0.6	D
Dr.2953.1.S1_at	<i>rasl11b</i>	<i>RAS-like, family 11, member B</i>	---	---	388.7	P	231.2	P	-0.6	D
Dr.15608.1.S1_at	<i>bag2</i>	<i>BCL2-associated athanogene 2</i>	Dr.51739	393109	288.5	P	193.1	P	-0.6	D
Dr.12644.1.S1_at	<i>smarcc1</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1</i>	Dr.33037	323226	186.8	P	130.5	P	-0.6	D
Dr.11661.1.S1_at	<i>ypel3</i>	<i>yippee-like 3</i>	Dr.13394	403010	970.2	P	928.9	P	-0.6	D
Dr.11240.1.A1_at	<i>inaa</i>	<i>internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a</i>	Dr.107569	406482	181.1	P	117.0	P	-0.6	D
Dr.10050.1.A2_at	---	---	Dr.691	447903	1151.7	P	791.5	P	-0.6	D
Dr.3197.1.A1_a_at	<i>chrna2b</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2b</i>	Dr.76395	541345	728.1	P	586.8	P	-0.6	D
Dr.4305.1.A1_at	<i>wsb1</i>	<i>WD repeat and SOCS box-containing 1</i>	Dr.79060	797943	1244.5	P	747.4	P	-0.6	D
Dr.11590.1.A1_at	<i>nr0b2a</i>	<i>nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2a</i>	Dr.76383	431737	386.0	P	273.6	P	-0.6	D

Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.10416.1.S1_at	<i>gdpd3</i>	<i>glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3</i>	Dr.124740	---	260.1	P	202.4	P	-0.6	D
Dr.691.1.S1_at	<i>zgc:101565</i>	<i>zgc:101565</i>	---	325783	1661.0	P	1064.1	P	-0.6	D
Dr.1131.1.A1_at	<i>zgc:110340</i>	<i>zgc:110340</i>	Dr.77454	393739	403.5	P	337.5	P	-0.6	D
Dr.4654.2.S1_a_at	<i>zgc:162126</i>	<i>zgc:162126</i>	Dr.11380	558396	111.5	P	69.7	P	-0.6	D
Dr.1289.1.S1_at	<i>zgc:91870</i>	<i>zgc:91870</i>	Dr.117443	393975	399.9	P	311.8	P	-0.6	D
Dr.25878.1.S1_at	---	---	Dr.396	550282	189.6	P	135.1	P	-0.6	D
Dr.11769.1.S1_at	<i>wu:fd11e07</i>	<i>wu:fd11e07</i>	Dr.10914	562007	269.0	P	204.3	P	-0.6	D
Dr.13557.2.S1_at	<i>zgc:73265</i>	<i>zgc:73265</i>	Dr.76866	403020	292.9	P	208.7	P	-0.6	D
Dr.11380.1.A1_at	<i>cyp27c1</i>	<i>cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1</i>	Dr.76875	368214	503.2	P	307.9	P	-0.6	D
Dr.396.1.A1_at	<i>dcxr</i>	<i>dicarbonyl/L-xylulose reductase</i>	Dr.82634	555251	612.0	P	377.4	P	-0.6	D
Dr.10914.1.A1_at	<i>zgc:154020</i>	<i>zgc:154020</i>	---	---	865.5	P	616.5	P	-0.6	D
Dr.6575.1.S1_at	<i>cebpb</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>	Dr.309	100329734 /// 30122 /// 553976	1554.9	P	1087.4	P	-0.5	D
Dr.3448.1.S1_at	<i>klf2a</i>	<i>Kruppel-like factor 2a</i>	Dr.5129	406840	436.4	P	259.8	P	-0.5	D
Dr.6295.1.S1_at	<i>lmo4a</i>	<i>LIM domain only 4a</i>	Dr.79988	140814	703.3	P	529.7	P	-0.5	D
Dr.309.1.S1_at	<i>LOC100329734 /// wnt8-2 /// wnt8a</i>	<i>Wnt8-like protein 2-like /// wnt8-like protein 2 /// wingless-type MMTV integration site family, member 8a</i>	Dr.29173	117508	1097.6	P	747.0	P	-0.5	D
Dr.540.1.S1_at	<i>rx3</i>	<i>retinal homeobox gene 3</i>	Dr.107376	114412	1655.7	P	1180.8	P	-0.5	D
Dr.20198.1.S1_a_at	<i>hsp70 /// hsp70l /// mcm5 /// zgc:174006</i>	<i>heat shock cognate 70-kd protein /// heat shock cognate 70-kd protein, like /// MCM5 minichromosome maintenance deficient 5 (S. cerevisiae) /// zgc:174006</i>	Dr.17322	563799	2058.4	P	1387.1	P	-0.5	D
Dr.24507.1.S1_at	<i>nfkbiab</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha b</i>	Dr.78086	393912	905.1	P	699.8	P	-0.5	D
Dr.5129.1.S1_at	<i>sesn3</i>	<i>sestrin 3</i>	Dr.21399	266794	4878.8	P	3391.3	P	-0.5	D
Dr.20808.1.S1_at	<i>b4galt6</i>	<i>UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6</i>	Dr.76942	403060	1526.4	P	1235.8	P	-0.5	D
Dr.18403.1.S1_at	<i>zgc:55572</i>	<i>zgc:55572</i>	Dr.18403	406765	193.5	P	119.4	P	-0.5	D
Dr.10552.1.S1_at	<i>mapk3</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>	Dr.75913	399480	555.7	P	393.6	P	-0.5	D
Dr.20969.1.S1_at	<i>foxl1</i>	<i>forkhead box I1</i>	---	368287	331.9	P	211.2	P	-0.5	D
Dr.25133.1.S1_at	<i>mcl1b</i>	<i>myeloid cell leukemia sequence 1b</i>	Dr.66624	798921	1641.7	P	1115.7	P	-0.5	D
Dr.4007.1.S1_at	<i>sp5l</i>	<i>Sp5 transcription factor-like</i>	Dr.34453	567402	4171.3	P	2823.2	P	-0.5	D
Dr.12550.1.S1_at	<i>acin1b</i>	<i>apoptotic chromatin condensation inducer 1b</i>	Dr.540	30474	664.2	P	453.6	P	-0.5	D
Dr.4412.7.S1_x_at	<i>wu:fi34e01</i>	<i>wu:fi34e01</i>	Dr.76123	393444	264.0	P	186.9	P	-0.5	D
Dr.1076.1.A1_at	<i>aldh18a1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1</i>	Dr.76195	557186	194.4	P	156.2	P	-0.5	D

Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.17570.2.A1_at	wu:fk57a03	wu:fk57a03	Dr.75602	561754	2191.9	P	1419.5	P	-0.5	D
Dr.9953.1.S1_at	sb:cb98	sb:cb98	Dr.75519	100126123 /// 286747 /// 30671 /// 560210	1214.3	P	845.3	P	-0.5	D
Dr.10519.1.A1_at	trim71	tripartite motif-containing 71	Dr.123643	---	2677.9	P	1998.6	P	-0.5	D
Dr.20083.1.A1_at	ccng2	cyclin G2	Dr.82930	---	953.1	P	733.8	P	-0.5	D
Dr.3197.1.A1_x_at	chrna2b	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2b	Dr.114174	321056	1018.1	P	840.0	P	-0.5	D
Dr.15833.1.A1_at	polr2a	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	Dr.148902	568849	1234.4	P	913.1	P	-0.5	D
Dr.42.1.A1_a_at	LOC100002829	Hypothetical LOC100002829	Dr.77409	323099	371.8	P	264.5	P	-0.5	D
Dr.20489.1.A1_at	si:dkey-1a7.2	si:dkey-1a7.2	Dr.79109	553347	328.5	P	256.1	P	-0.5	D
Dr.26527.1.S1_at	acin1a	apoptotic chromatin condensation inducer 1a	Dr.75427	567461	463.8	P	309.6	P	-0.5	D
Dr.2845.1.A1_at	im:7165255	im:7165255	Dr.78754	565972	964.0	P	738.6	P	-0.5	D
Dr.17322.1.A1_at	ash1l	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	---	386815	148.5	P	85.5	P	-0.5	D
Dr.22614.1.A1_at	myo5b	Myosin VB	Dr.75366	100002829	414.5	P	276.2	P	-0.5	D
Dr.17491.1.A1_at	pygmb	phosphorylase, glycogen (muscle) b	Dr.71417	568761	387.2	P	313.4	P	-0.5	D
Dr.20839.1.A1_x_at	---	---	Dr.77474	322997	205.3	P	130.6	P	-0.5	D
Dr.16267.1.A1_at	---	---	Dr.74606	368893	1712.9	P	779.0	P	-0.5	D
Dr.10476.1.A1_at	si:dkey-181m9.9	si:dkey-181m9.9	Dr.78754	565972	201.2	P	132.4	P	-0.5	D
Dr.10234.1.S1_at	ftr83	finTRIM family, member 83	Dr.79983	563054	674.6	P	450.7	P	-0.5	D
Dr.19939.1.A1_at	zgc:63569	zgc:63569	Dr.80835	100005564	130.1	P	87.2	P	-0.5	D
Dr.24771.1.A1_at	smc1al	structural maintenance of chromosomes 1A, like	Dr.22535	565377	793.0	P	497.9	P	-0.5	D
Dr.17099.2.A1_at	ell2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	Dr.78159	567180	343.0	P	290.4	P	-0.5	D
Dr.15042.1.A1_at	LOC558518 /// rlf	novel protein similar to human rearranged L-myc fusion sequence (RLF) /// rearranged L-myc fusion	---	334171	76.7	P	69.5	A	-0.5	D
Dr.10234.2.S1_a_at	ftr83	finTRIM family, member 83	Dr.41358	558518 /// 562452	574.6	P	333.8	P	-0.5	D
Dr.1015.2.S1_x_at	si:ch211-217k17.9	si:ch211-217k17.9	---	100330922	14794.2	P	10909.5	P	-0.5	D
Dr.6268.1.A1_at	wu:fe11c03	wu:fe11c03	Dr.12550	327495	484.2	P	323.0	P	-0.5	D
Dr.6157.2.A1_at	si:ch73-13b6.3	si:ch73-13b6.3	Dr.78445	324261	182.0	P	133.9	P	-0.5	D
Dr.20642.1.A1_at	LOC567180	novel protein similar to vertebrate Rho guanine exchange factor (GEF) 16 (ARHGEF16)	Dr.26893	373102	215.6	P	161.8	P	-0.5	D
Dr.17272.1.A1_at	LOC100330922	hypothetical protein LOC100330922	Dr.14641	---	519.3	P	318.8	P	-0.5	D
Dr.14641.1.A1_at	---	---	Dr.13171	541448	406.5	P	265.9	P	-0.5	D

Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.13171.1.A1_at	<i>zgc:113346</i>	<i>zgc:113346</i>	Dr.115943	570565	1510.8	P	1172.1	P	-0.5	D
Dr.16727.1.A1_at	<i>LOC570565</i>	<i>Similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17</i>	---	100318736	545.6	P	434.6	P	-0.5	D
Dr.22535.1.A1_at	<i>LOC565377</i>	<i>putative transmembrane protein TA-2-like</i>	Dr.20969	353313	267.7	P	139.9	P	-0.5	D
AFFX-BioB-5_at	---	---	---	---	460.7	P	361.0	P	-0.4	D
Dr.450.1.S1_at	<i>cahz</i>	<i>carbonic anhydrase</i>	Dr.107097	335159	1523.0	P	1108.1	P	-0.4	D
Dr.559.2.S1_a_at	<i>vasa</i>	<i>vasa homolog</i>	Dr.11532	393891	230.7	P	172.8	P	-0.4	D
Dr.179.1.S1_at	<i>tbx16</i>	<i>T-box gene 16</i>	Dr.32297	30331	1864.9	P	1405.7	P	-0.4	D
Dr.18845.1.S2_at	<i>dmbx1a</i>	<i>diencephalon/mesencephalon homeobox 1a</i>	Dr.76586	393556	1237.0	P	912.1	P	-0.4	D
Dr.587.1.S1_at	<i>foxb1.2</i>	<i>forkhead box B1.2</i>	Dr.2851	100004437	944.3	P	694.8	P	-0.4	D
Dr.9976.1.S1_at	<i>klf2b</i>	<i>Kruppel-like factor 2b</i>	Dr.559	30263	660.7	P	412.0	P	-0.4	D
Dr.10670.1.S1_at	<i>fezf2</i>	<i>FEZ family zinc finger 2</i>	Dr.75456	30264	265.9	P	203.9	P	-0.4	D
Dr.25497.1.S1_at	<i>szl</i>	<i>sizzled</i>	Dr.78986	142987	679.8	P	537.1	P	-0.4	D
Dr.20125.1.A1_s_at	<i>zgc:111983</i>	<i>zgc:111983</i>	Dr.798	334627	312.1	P	301.7	P	-0.4	D
Dr.9794.1.S1_at	<i>zgc:56699</i>	<i>zgc:56699</i>	Dr.66624	798921	2162.7	P	1803.9	P	-0.4	D
Dr.24528.1.S1_at	<i>rps6kb1</i>	<i>ribosomal protein S6 kinase b, polypeptide 1</i>	Dr.105557	402843	1516.4	P	1341.0	P	-0.4	D
Dr.11532.1.S1_at	<i>fbxo32</i>	<i>F-box protein 32</i>	Dr.75814	30542	530.3	P	335.2	P	-0.4	D
Dr.10168.2.S1_at	<i>maf</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	Dr.9976	117509	165.7	P	131.4	P	-0.4	D
Dr.20198.2.S1_x_at	<i>hsp70</i>	<i>heat shock cognate 70-kd protein</i>	---	100334570	748.5	P	539.1	P	-0.4	D
Dr.19888.1.S1_at	<i>ved</i>	<i>ventrally expressed dharm/bozozok antagonist</i>	Dr.124812	---	2326.7	P	1558.3	P	-0.4	D
Dr.15115.1.S1_at	<i>rtf1</i>	<i>Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)</i>	Dr.76148	378746	902.8	P	717.5	P	-0.4	D
Dr.4412.3.A1_x_at	<i>spna2</i>	<i>spectrin alpha 2</i>	Dr.82591	60634	252.8	P	195.5	P	-0.4	D
Dr.25140.7.A1_a_at	<i>epcam /// wu:fb11f01 /// zgc:110304</i>	<i>epithelial cell adhesion molecule /// wu:fb11f01 /// zgc:110304</i>	---	---	6029.6	P	4758.0	P	-0.4	D
Dr.25156.2.A1_x_at	---	---	Dr.151461	100002269	184.8	P	129.0	P	-0.4	D
Dr.12439.4.A1_x_at	<i>LOC100301575</i>	<i>novel rhamnose binding lectin-like</i>	Dr.85465	553796	550.5	P	387.2	P	-0.4	D
Dr.3418.1.A1_at	<i>atp2b1a</i>	<i>ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1a</i>	Dr.75602	561754	1981.9	P	1608.0	P	-0.4	D
Dr.798.1.A1_at	<i>ubr5</i>	<i>ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5</i>	---	100301575	1676.4	P	1228.4	P	-0.4	D
Dr.3936.1.A1_at	<i>zgc:162730</i>	<i>zgc:162730</i>	Dr.122458	---	928.6	P	853.5	P	-0.4	D
Dr.10050.1.A1_at	<i>adipor2</i>	<i>adiponectin receptor 2</i>	---	---	483.8	P	368.2	P	-0.4	D
Dr.24902.1.S1_at	<i>si:ch211-133n4.4</i>	<i>si:ch211-133n4.4</i>	Dr.33371	569471	1976.2	P	1583.7	P	-0.4	D
Dr.12835.1.A1_at	---	---	Dr.41358	562452	698.2	P	513.3	P	-0.4	D
Dr.17114.1.A1_at	---	---	Dr.2542	568475	781.3	P	581.1	P	-0.4	D

Table 25 (Continue)

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.7666.1.S1_at	---	---	Dr.84079	353294	442.1	P	377.2	P	-0.4	D
Dr.25534.1.S1_at	<i>sfrp1a</i>	<i>secreted frizzled-related protein 1a</i>	---	---	1898.0	P	1486.0	P	-0.4	D
Dr.11086.1.A1_at	<i>LOC100334570</i>	<i>bromodomain containing 4-like</i>	Dr.74540	559260	1314.5	P	1018.7	P	-0.4	D
Dr.7862.1.A1_at	<i>acsbg2</i>	<i>acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2</i>	Dr.106159	564559	575.6	P	428.8	P	-0.4	D
Dr.6240.1.A1_at	<i>chd7</i>	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 7</i>	Dr.13001	560190	967.4	P	795.9	P	-0.4	D
Dr.21161.1.A1_at	<i>wu:fb82f02</i>	<i>wu:fb82f02</i>	Dr.39071	336480 /// 406454 /// 550255	258.6	P	172.7	P	-0.4	D
Dr.13001.1.A1_at	<i>esrp1</i>	<i>epithelial splicing regulatory protein 1</i>	Dr.4740	550501	1260.1	P	1127.9	P	-0.4	D
Dr.25118.1.S1_at	<i>acer1</i>	<i>alkaline ceramidase 1</i>	Dr.43299	553383	146.3	P	96.4	P	-0.4	D
Dr.22620.1.S1_at	<i>gstt1b</i>	<i>glutathione S-transferase theta 1b</i>	Dr.75477	10000471	209.2	P	158.9	P	-0.4	D
Dr.2851.1.A1_at	<i>si:dkey-39n1.3</i>	<i>si:dkey-39n1.3</i>	Dr.81899	405758	469.9	P	353.9	P	-0.4	D
Dr.1015.1.A1_at	<i>si:ch211-217k17.9</i>	<i>si:ch211-217k17.9</i>	Dr.76719	406642	2178.5	P	1498.0	P	-0.4	D
Dr.25767.1.S1_x_at	---	---	Dr.24528	406349	4652.1	P	3328.2	P	-0.4	D
Dr.3115.1.A1_at	---	---	---	---	374.3	P	318.0	P	-0.4	D
Dr.18115.1.S1_at	<i>zgc:171671</i>	<i>zgc:171671</i>	Dr.115604	794319	522.0	P	373.7	P	-0.4	D
Dr.26135.2.S1_at	<i>arl6ip4</i>	<i>ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 4</i>	Dr.77547	554458	372.0	P	281.5	P	-0.4	D
Dr.25667.1.A1_at	<i>trim71</i>	<i>tripartite motif-containing 71</i>	Dr.133268	---	1722.0	P	1443.9	P	-0.4	D
Dr.9510.1.A1_at	---	---	Dr.80506	550266	394.5	P	273.9	P	-0.4	D
Dr.4738.1.A1_at	---	---	Dr.88295	368201	959.2	P	713.4	P	-0.4	D
Dr.14686.1.S1_at	<i>rlf</i>	<i>rearranged L-myc fusion</i>	Dr.148902	568849	740.2	P	596.5	P	-0.4	D
Dr.26398.2.S1_at	<i>wu:fb77e12</i>	<i>Wu:fb77e12</i>	Dr.10050	560140	261.9	P	194.2	P	-0.4	D
Dr.15690.2.S1_x_at	<i>sltm</i>	<i>SAFB-like, transcription modulator</i>	---	323126	128.2	P	70.5	P	-0.4	D
Dr.17745.1.A1_at	<i>LOC794319</i>	<i>natterin-like protein-like</i>	---	---	724.5	P	349.4	P	-0.4	D
Dr.21859.1.A1_at	<i>zgc:100868</i>	<i>Zgc:100868</i>	Dr.120867	114467	409.6	P	313.2	P	-0.4	D
Dr.24286.1.A1_at	---	---	---	---	1539.9	P	1047.7	P	-0.4	D
Dr.3197.3.A1_x_at	<i>chrna2b</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2b (neuronal)</i>	Dr.114305	30671	835.2	P	658.3	P	-0.4	D
Dr.5578.2.S1_a_at	<i>odc1</i>	<i>ornithine decarboxylase 1</i>	Dr.81309	30648	4022.9	P	3198.4	P	-0.3	D
Dr.8135.1.S1_at	<i>psme1</i>	<i>proteasome activator subunit 1</i>	Dr.78653	114426	211.9	P	159.4	P	-0.3	D
Dr.592.1.S1_at	<i>foxd5</i>	<i>forkhead box D5</i>	Dr.75102	30138	1421.9	P	1287.5	P	-0.3	D
Dr.194.1.S1_at	<i>rarga</i>	<i>retinoic acid receptor gamma a</i>	Dr.76633	114429	863.3	P	645.6	P	-0.3	D
Dr.20958.1.S1_at	<i>dld</i>	<i>deltaD</i>	Dr.23391	327276	1588.3	P	1303.2	P	-0.3	D
Dr.20027.1.S1_at	<i>znf703</i>	<i>zinc finger protein 703</i>	Dr.75930	321330	1396.0	P	994.4	P	-0.3	D

Table 25 (Continue)

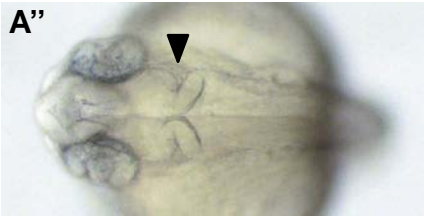
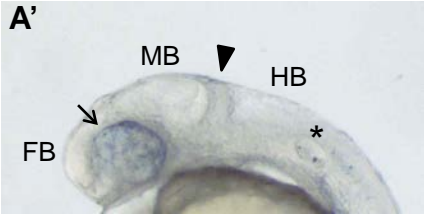
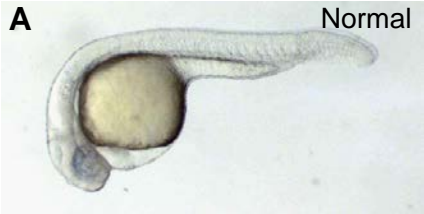
Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	HS-gbx(-)		HS-gbx(+)		Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
					Signal	Detection	Signal	Detection		
Dr.7337.1.S1_at	<i>slc16a3</i>	<i>solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3</i>	Dr.13792	394104	139.2	P	106.0	P	-0.3	D
Dr.8587.1.A1_at	<i>igfbp1a</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein 1a</i>	Dr.75818	30524	124.2	P	78.5	A	-0.3	D
Dr.2360.1.S1_at	<i>rhpn2</i>	<i>rhopilin, Rho GTPase binding protein 2</i>	Dr.12713	393909	546.6	P	442.4	P	-0.3	D
Dr.13792.1.S1_at	<i>zgc:55307</i>	<i>zgc:55307</i>	Dr.75334	321033	1994.0	P	1610.2	P	-0.3	D
Dr.12713.1.S1_at	<i>pitpna</i>	<i>phosphatidylinositol transfer protein, alpha</i>	---	321034	902.3	P	749.3	P	-0.3	D
Dr.10742.2.S1_a_at	<i>zgc:55259</i>	<i>zgc:55259</i>	Dr.22122	569949	1900.1	P	1420.7	P	-0.3	D
DrAffx.1.45.S1_at	<i>znfl1</i>	<i>zinc finger-like gene 1</i>	Dr.77664	338155	880.5	P	767.3	P	-0.3	D
Dr.1149.1.A1_a_at	<i>hnrnpa0</i>	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0</i>	Dr.35374	334222	6846.5	P	5514.4	P	-0.3	D
Dr.15366.1.S1_at	<i>rock2b</i>	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2b</i>	Dr.23544	30606	192.7	P	162.2	P	-0.3	D
Dr.4412.9.A1_x_at	---	---	Dr.142305	---	1229.1	P	834.6	P	-0.3	D
Dr.11508.3.A1_at	---	---	---	325849	807.1	P	684.8	P	-0.3	D
Dr.4011.1.S1_at	<i>sb:cb11</i>	<i>sb:cb11</i>	Dr.124812	---	2298.7	P	1768.2	P	-0.3	D
Dr.9357.1.A1_at	<i>aif1l</i>	<i>allograft inflammatory factor 1-like</i>	Dr.86524	569958	2524.9	P	1697.7	P	-0.3	D
Dr.10525.1.S1_at	<i>hectd1</i>	<i>HECT domain containing 1</i>	Dr.155331	---	1505.0	P	1278.8	P	-0.3	D
Dr.16052.1.S1_at	<i>si:dkey-52k20.7</i>	<i>si:dkey-52k20.7</i>	Dr.85469	393819	177.0	P	156.2	P	-0.3	D
Dr.18186.1.S1_at	<i>LOC569958</i>	<i>S100-A5-like</i>	Dr.87825	503502	73.6	P	64.9	A	-0.3	D
Dr.15287.1.S1_at	---	---	Dr.85408	100148022	2134.6	P	1668.4	P	-0.3	D
Dr.12478.1.S1_at	<i>wu:fb50h02</i>	<i>wu:fb50h02</i>	---	---	1201.3	P	908.5	P	-0.3	D
Dr.19568.1.A1_at	<i>zgc:92280</i>	<i>Zgc:92280</i>	Dr.104970	560439	2340.8	P	2058.4	P	-0.3	D
Dr.11292.1.A1_at	<i>wu:fd13h03</i>	<i>wu:fd13h03</i>	Dr.78767	100002034	1206.5	P	1082.2	P	-0.3	D
Dr.6709.1.S1_at	<i>LOC565309</i>	<i>es1 protein-like</i>	Dr.6709	565309	6772.0	P	5439.4	P	-0.3	D
Dr.1248.1.S1_at	<i>zgc:153665</i>	<i>zgc:153665</i>	Dr.115918	---	3053.2	P	2377.7	P	-0.3	D
Dr.9070.2.A1_at	<i>srsf6a</i>	<i>serine/arginine-rich splicing factor 6a</i>	Dr.76364	768299	2827.8	P	2527.8	P	-0.3	D
Dr.25767.1.S1_at	---	---	---	327352	5469.5	P	4314.9	P	-0.3	D
Dr.20515.1.A1_at	---	---	Dr.22236	321070	126.5	P	97.6	P	-0.3	D
Dr.15283.2.S1_at	<i>wu:fi04c06</i>	<i>wu:fi04c06</i>	Dr.151940	373086	423.8	P	336.6	P	-0.3	D
Dr.15456.1.A1_at	<i>zgc:174263</i>	<i>zgc:174263</i>	Dr.9070	406775	324.9	P	286.2	P	-0.3	D
Dr.15961.1.A1_at	<i>arl5c</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 5C</i>	Dr.76315	317638	1964.7	P	1505.7	P	-0.3	D
Dr.21961.1.A1_at	<i>crabp2b</i>	<i>cellular retinoic acid binding protein 2, b</i>	Dr.84286	---	1630.3	P	1192.3	P	-0.3	D
Dr.26111.1.A1_at	---	---	Dr.78074	492338	298.4	P	210.7	P	-0.3	D
Dr.26014.1.A1_at	<i>zgc:91996</i>	<i>zgc:91996</i>	Dr.76761	445480	793.0	P	721.4	P	-0.3	D
Dr.20136.1.S1_at	<i>wu:fd14g04</i>	<i>wu:fd14g04</i>	---	327151	254.1	P	246.1	P	-0.2	D
Dr.2321.1.S1_at	<i>zgc:152778</i>	<i>zgc:152778</i>	Dr.79215	553349	1727.6	P	1390.8	P	-0.2	D
Dr.11351.1.A1_at	<i>zgc:73324</i>	<i>zgc:73324</i>	Dr.78050	393762	93.4	P	74.0	P	-0.2	D

Table 26. 2回のマイクロアレイ解析で共に発現上昇または低下が見出された遺伝子

Probe Name	Gene Symbol	Gene Title	UniGene ID	Entrez Gene	<i>hsp-gbx2</i> <sup>+/-</sup>			
					35 °C, 15 min., 0 hph		37 °C, 30 min., 2 hph	
					Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change	Signal Log <sub>2</sub> Ratio	Change
Dr.11609.1.S1_at	<i>LOC402847</i>	<i>hypothetical protein LOC402847</i>	Dr.79676	402847	0.9	I	0.8	I
Dr.13616.1.A1_at	---	---	Dr.24982	393297	0.8	I	0.5	I
Dr.2087.1.A1_at	<i>wu:fc84b06</i>	<i>wu:fc84b06</i>	Dr.82617	393783	0.8	I	0.6	I
Dr.3715.1.A1_at	<i>grcc10</i>	<i>gene rich cluster, C10 gene</i>	Dr.46820	79381	0.7	I	0.4	I
Dr.14123.1.A1_at	<i>atp5ia</i>	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e, duplicate a</i>	Dr.19947	321314	0.5	I	0.5	I
Dr.24982.1.S1_at	<i>zgc:56585</i>	<i>zgc:56585</i>	Dr.83404	378726	0.4	I	0.5	I
Dr.16322.1.A1_at	<i>add1</i>	<i>adducin 1 (alpha)</i>	Dr.148831	555511	-0.6	D	-0.7	D
Dr.96.1.A1_at	<i>c7</i>	<i>complement component 7</i>	Dr.29406	327417	-0.6	D	-0.7	D
Dr.11240.1.A1_at	<i>inaa</i>	<i>internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a</i>	Dr.107569	406482	-0.5	D	-0.6	D
Dr.16727.1.A1_at	<i>LOC570565</i>	<i>Similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17</i>	---	100318736	-0.5	D	-0.5	D
Dr.12573.1.S1_at	<i>sox32</i>	<i>SRY-box containing gene 32</i>	Dr.133216	116990	-0.4	D	-1.9	D
Dr.226.1.S1_at	<i>hexx1</i>	<i>homeo box (expressed in ES cells) 1</i>	Dr.258	30333	-0.4	D	-0.7	D
Dr.6884.1.S1_at	<i>zgc:55813</i>	<i>zgc:55813</i>	Dr.51235	570832	-0.4	D	-0.7	D
Dr.24771.1.A1_at	<i>smc1al</i>	<i>structural maintenance of chromosomes 1A, like</i>	Dr.22535	565377	-0.4	D	-0.5	D
Dr.23039.1.S1_at	---	---	---	323972	-0.4	D	-1.2	D
Dr.3448.1.S1_at	<i>klf2a</i>	<i>Kruppel-like factor 2a</i>	Dr.5129	406840	-0.3	D	-0.5	D
Dr.463.1.S1_at	<i>her5</i>	<i>hairy-related 5</i>	Dr.148902	568849	-0.3	D	-0.6	D
Dr.2953.1.S1_at	<i>rasl11b</i>	<i>RAS-like, family 11, member B</i>	---	---	-0.3	D	-0.6	D
Dr.10168.2.S1_at	<i>maf</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	Dr.9976	117509	-0.3	D	-0.4	D
Dr.20969.1.S1_at	<i>foxi1</i>	<i>forkhead box I1</i>	---	368287	-0.3	D	-0.5	D
Dr.14266.1.A1_at	<i>ankrd52</i>	<i>ankyrin repeat domain 52</i>	---	---	-0.3	D	-0.9	D
Dr.6268.1.A1_at	<i>wu:fe11c03</i>	<i>wu:fe11c03</i>	Dr.12550	327495	-0.3	D	-0.5	D
Dr.11351.1.A1_at	<i>zgc:73324</i>	<i>zgc:73324</i>	Dr.78050	393762	-0.3	D	-0.2	D
Dr.5129.1.S1_at	<i>sesn3</i>	<i>sestrin 3</i>	Dr.21399	266794	-0.2	D	-0.5	D

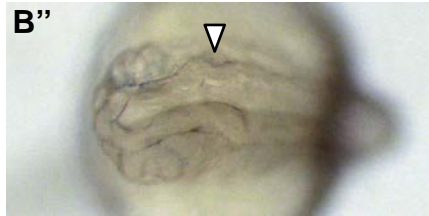
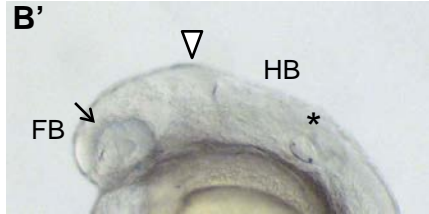
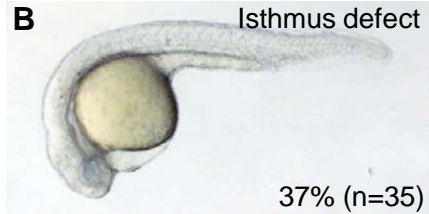


*egfp* (30 pg/embryo)

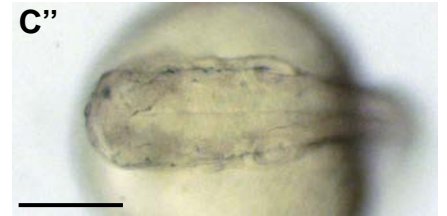
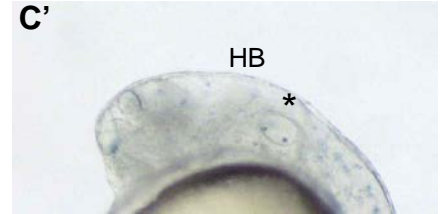
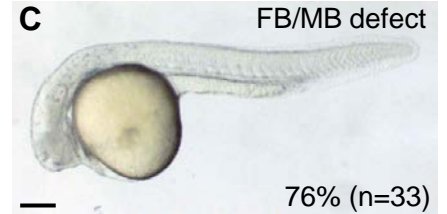


*gbx2*

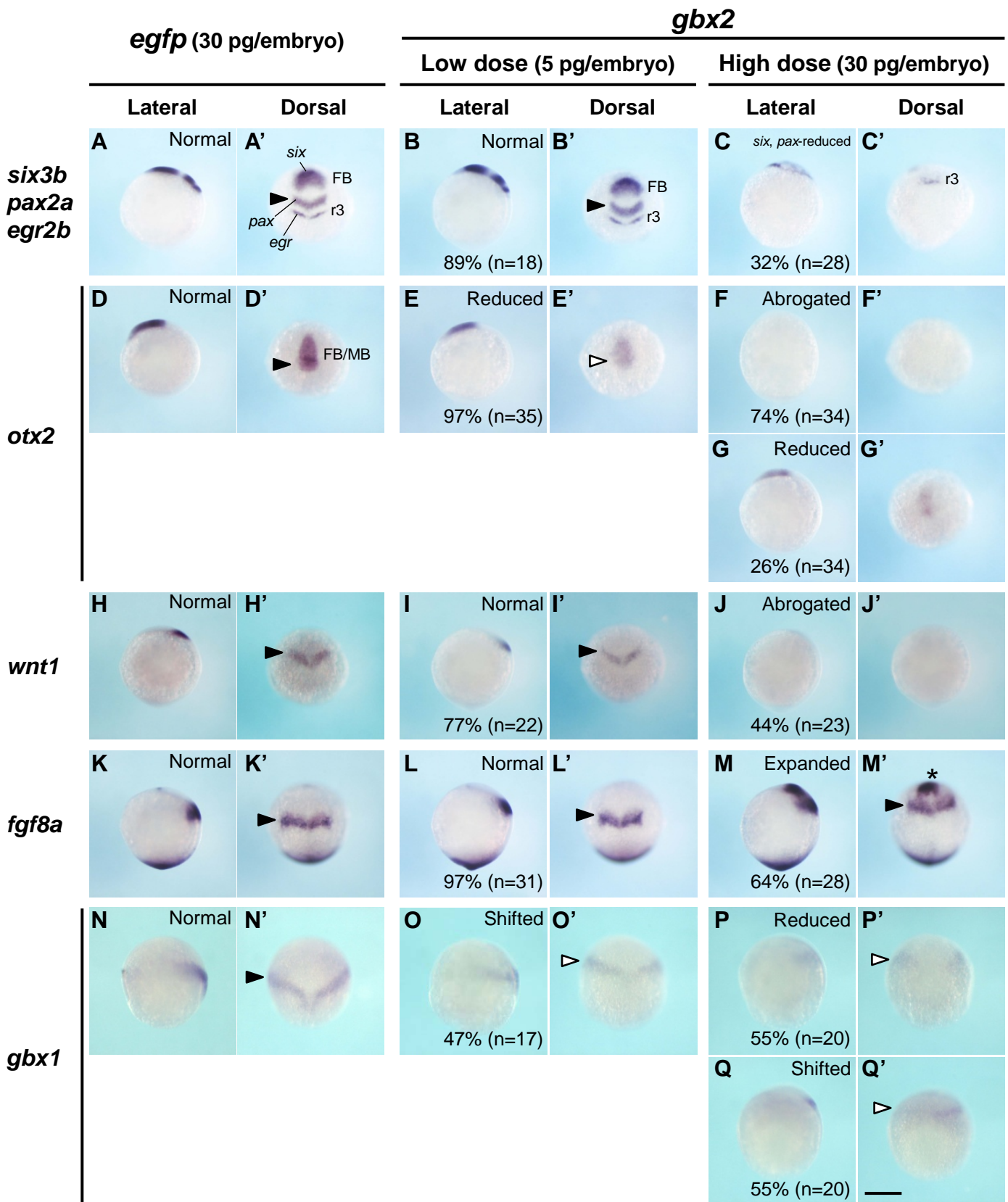
Low dose (5 pg/embryo)



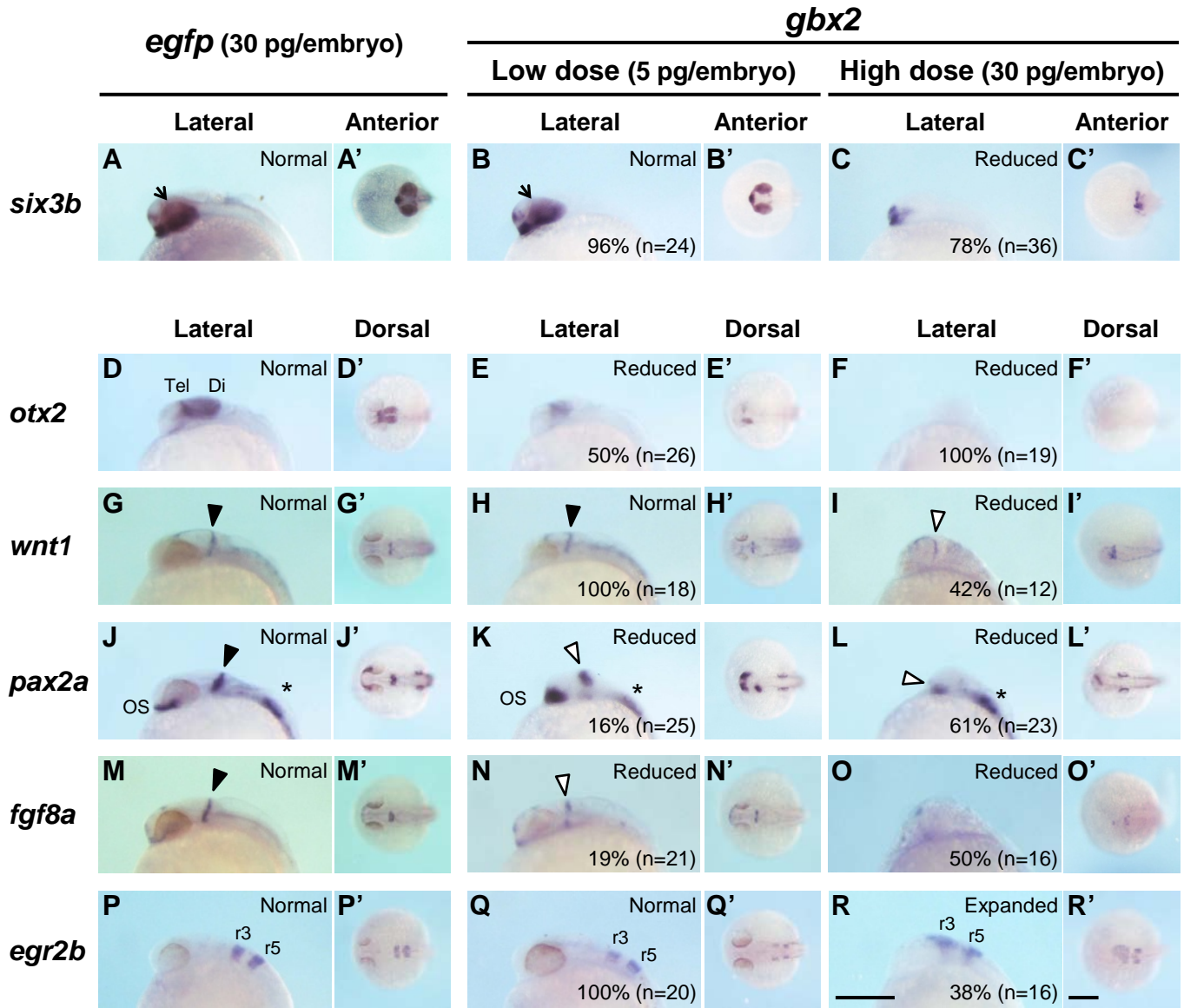
High dose (30 pg/embryo)



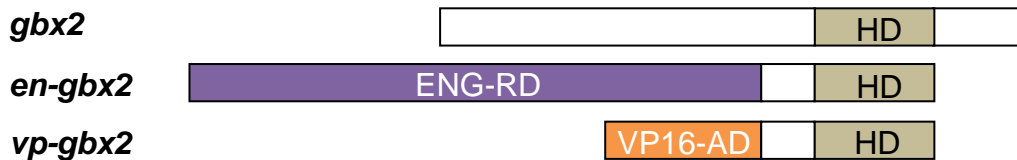
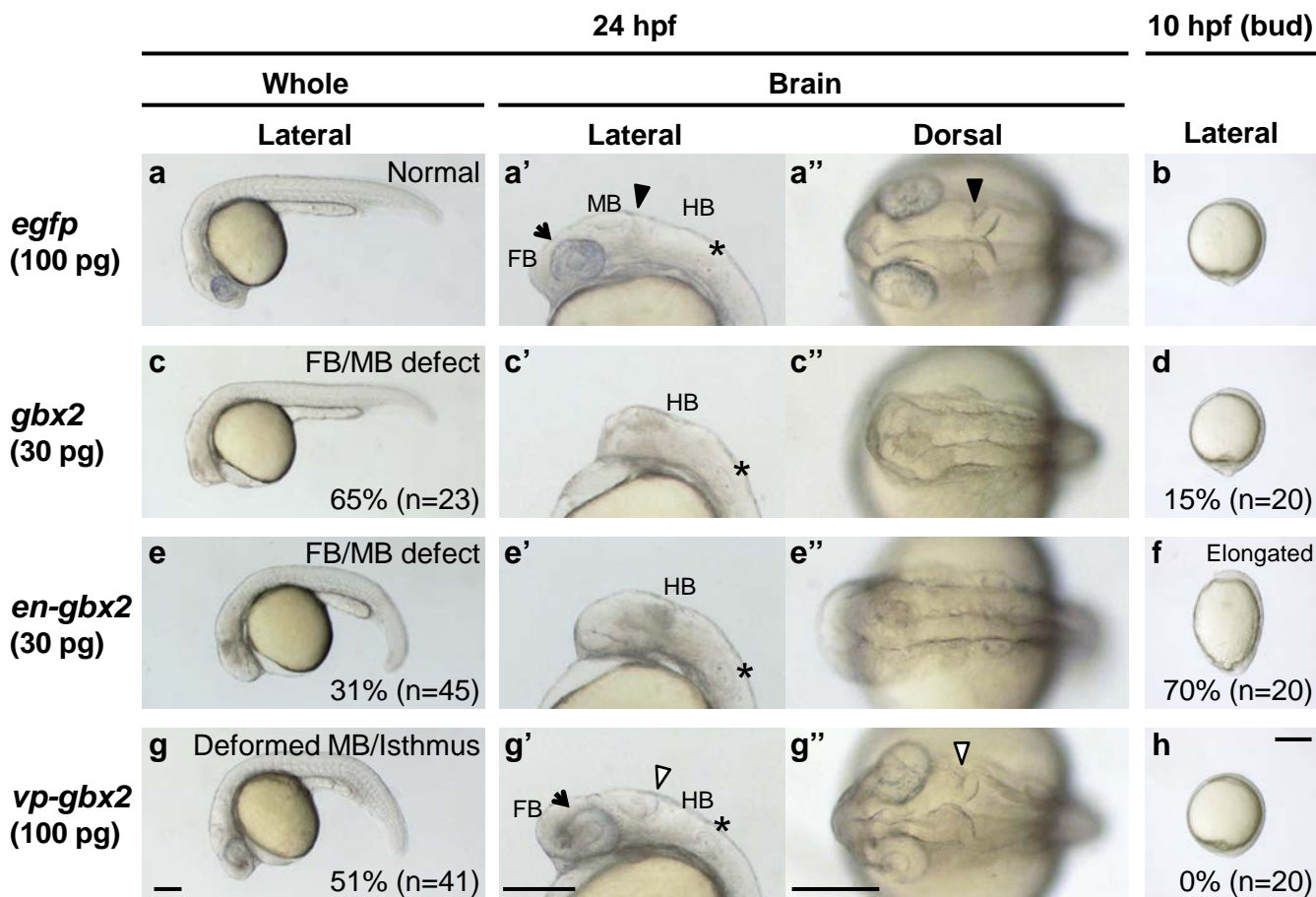
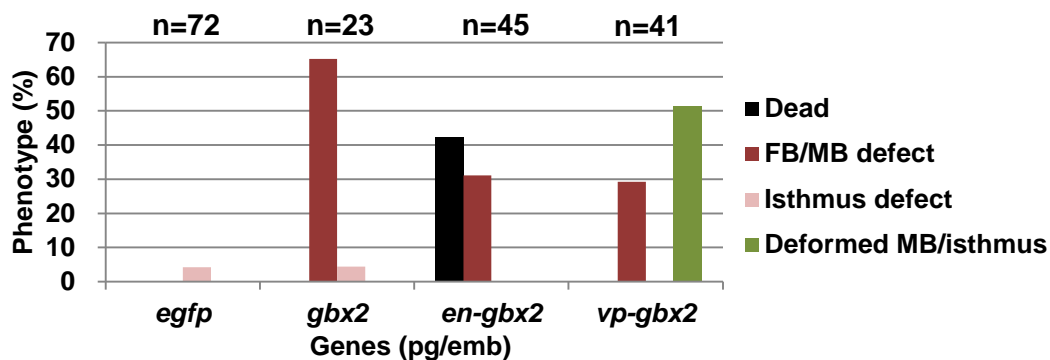
**Figure 1**

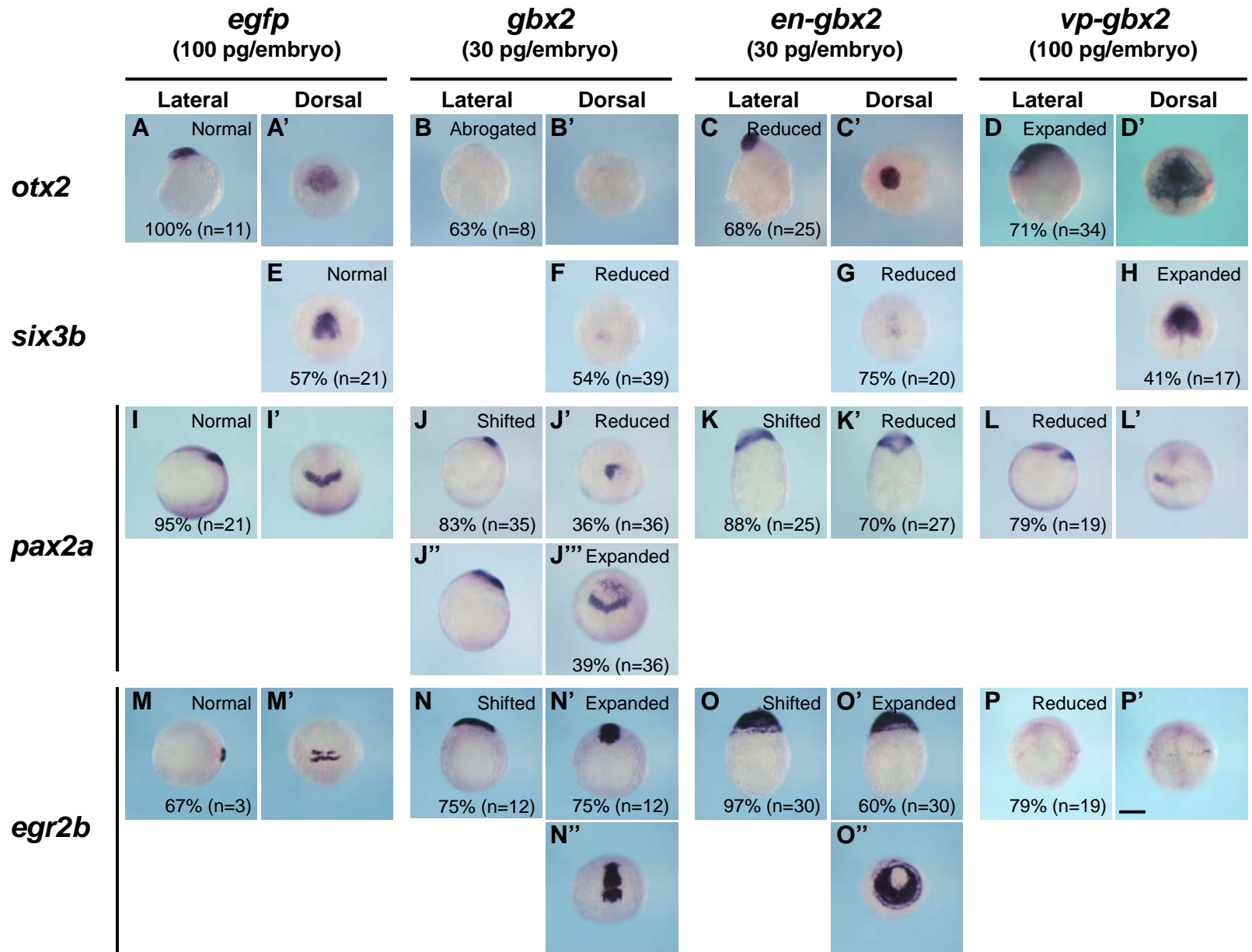


**Figure 2**



**Figure 3**

**A****B****C****Figure 4**



**Figure 5**



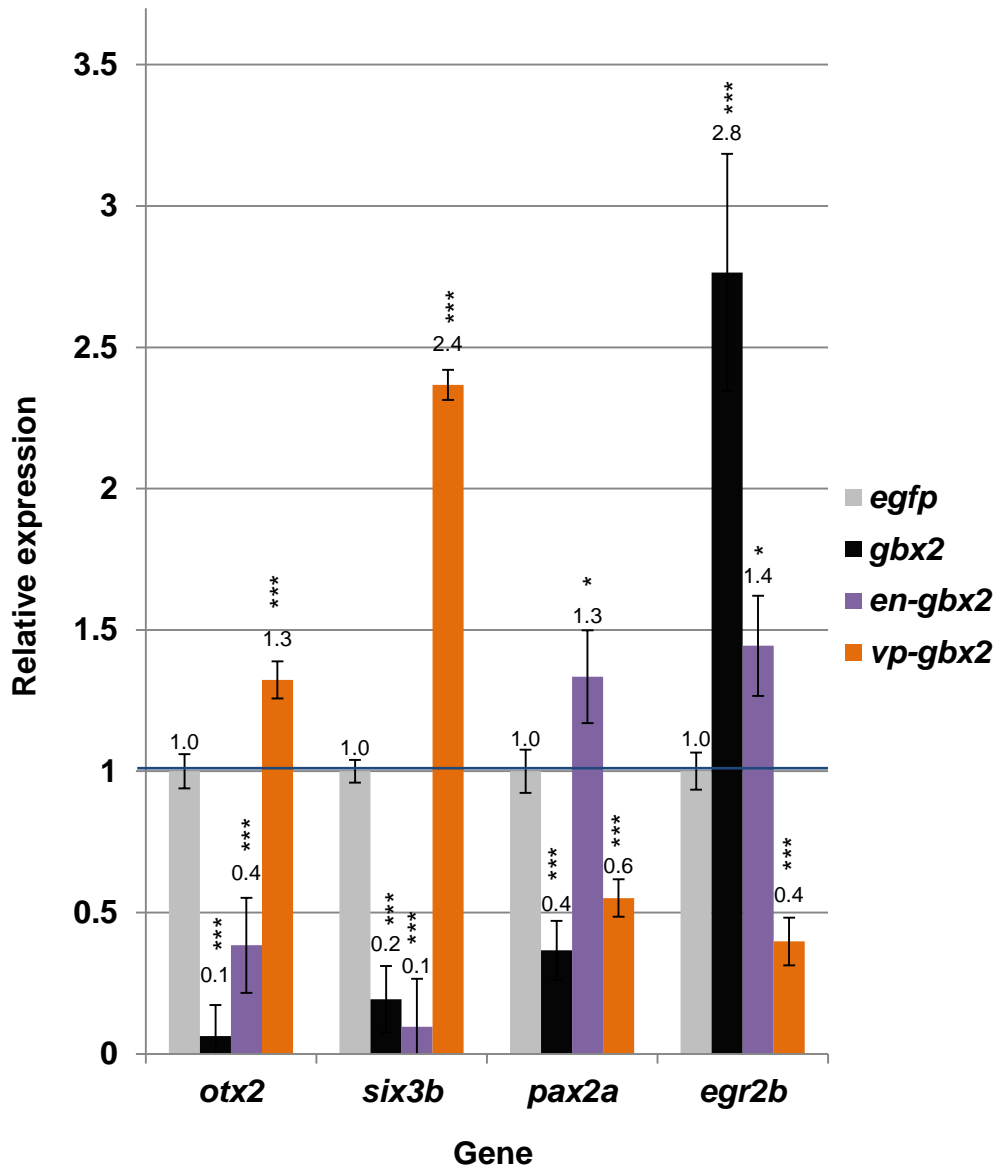
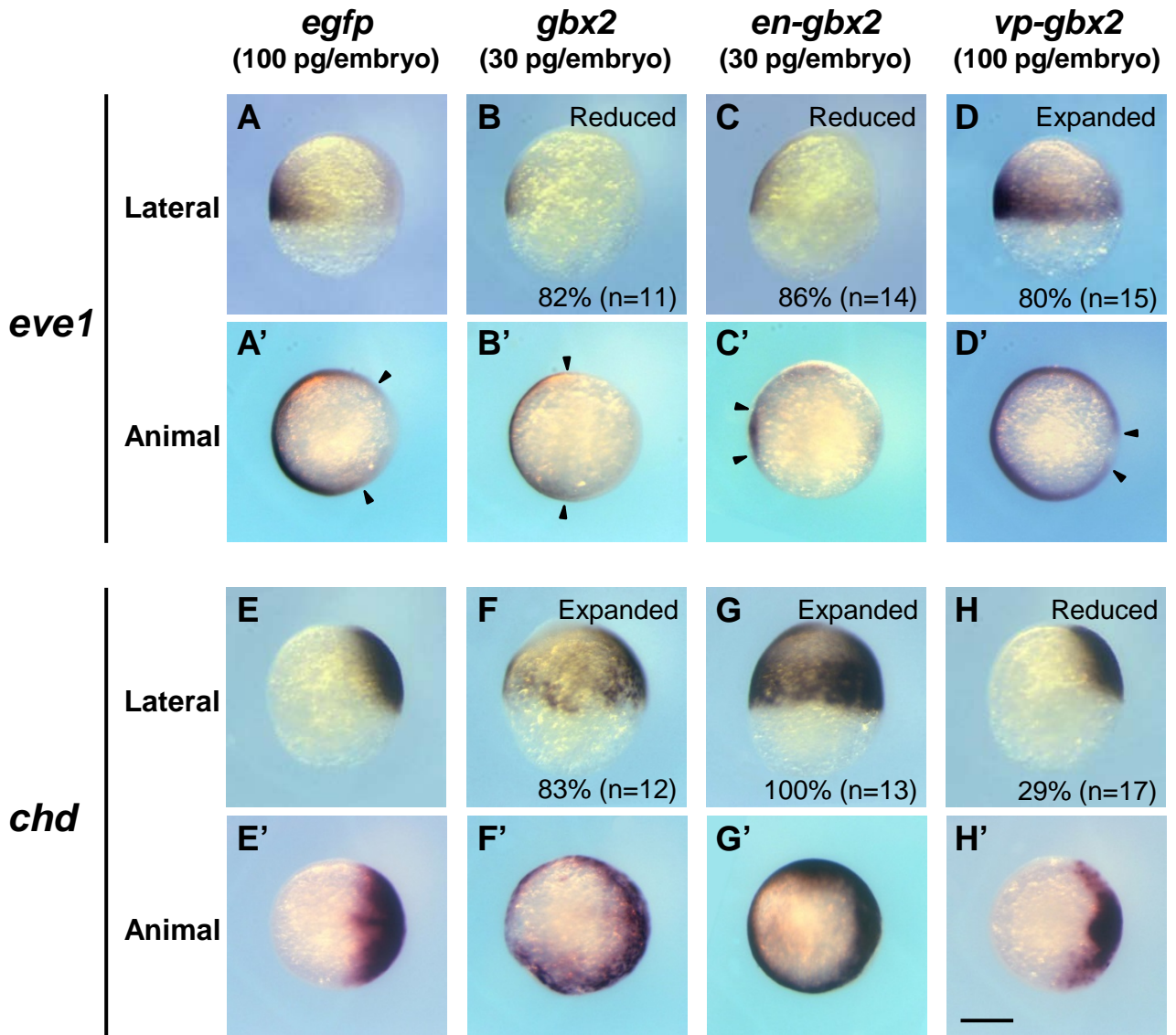
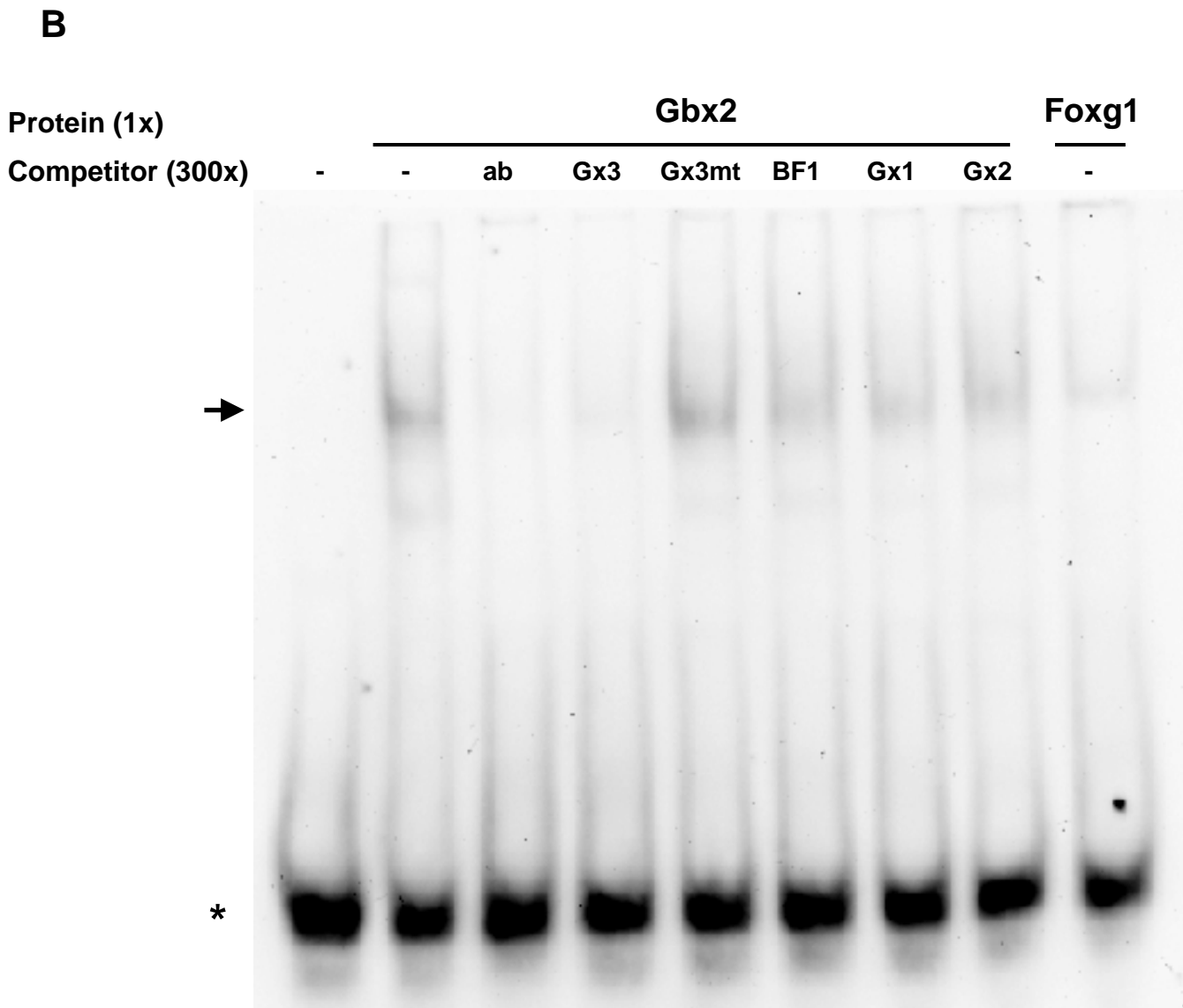
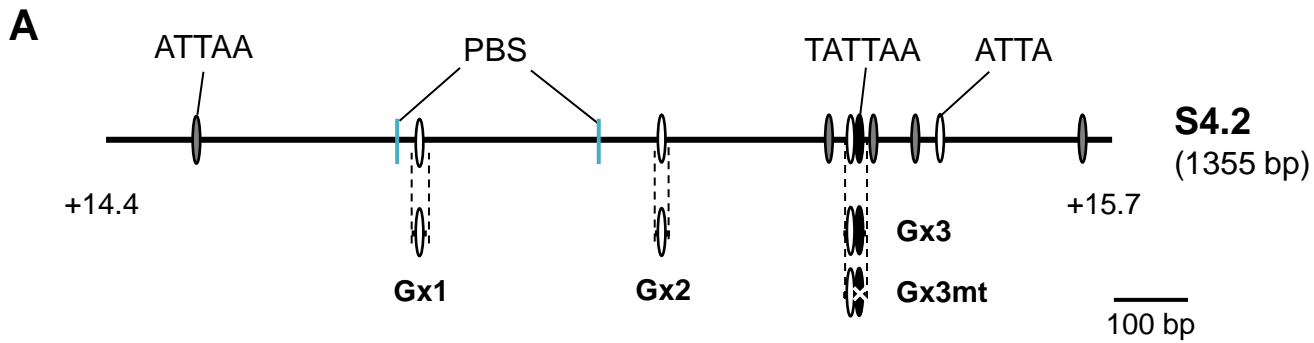


Figure 6

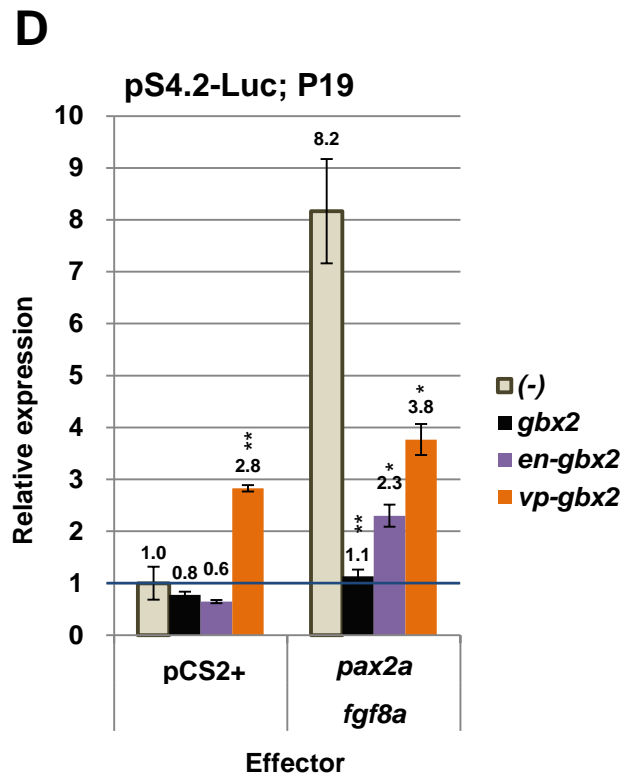
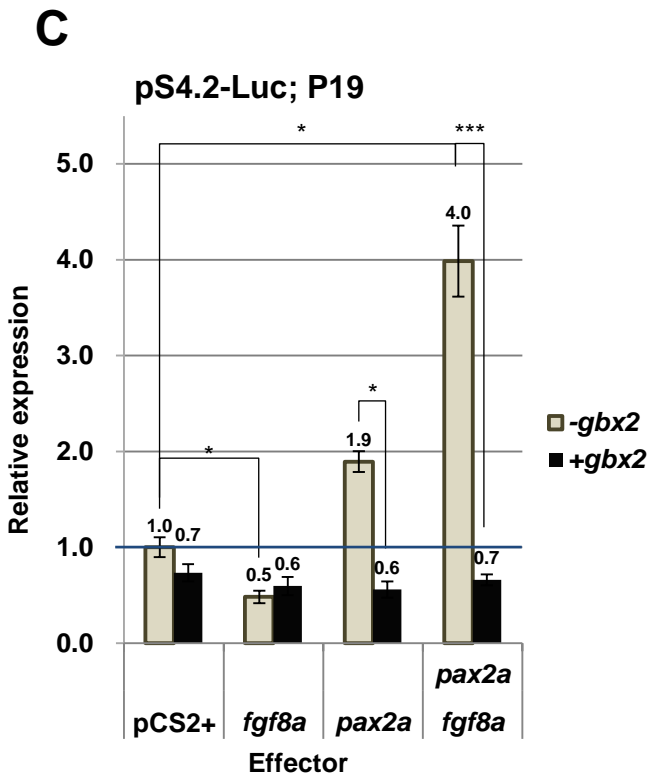
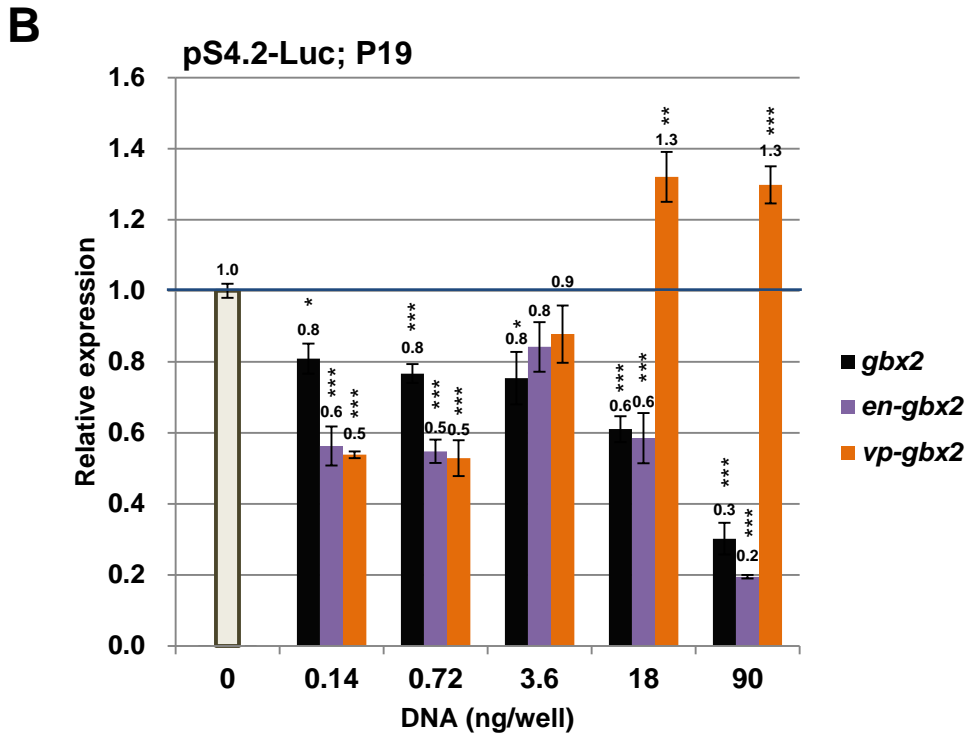
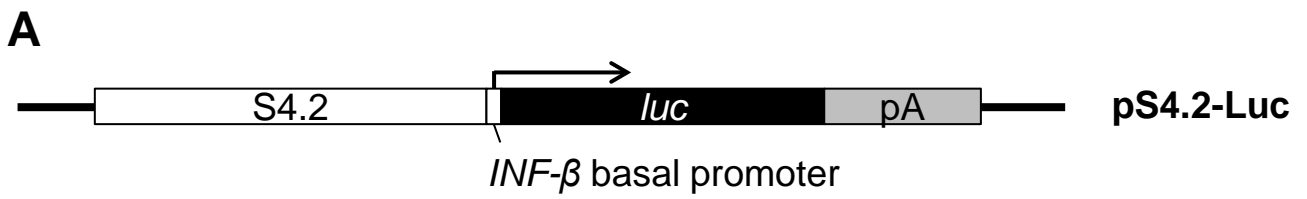


**Figure 7**



**Figure 8**



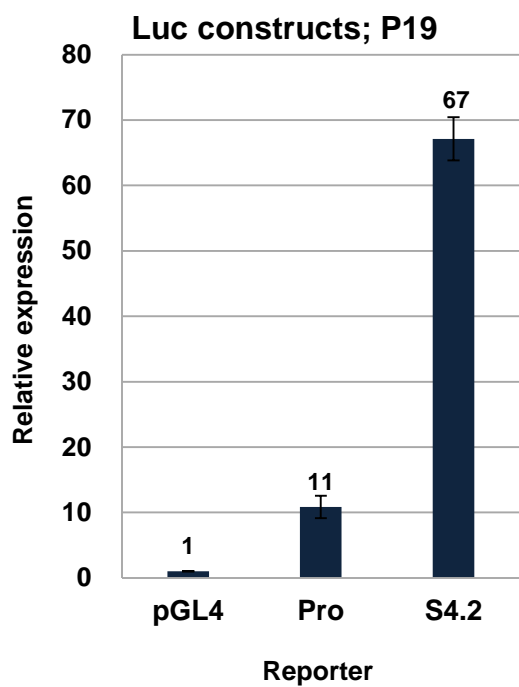


**Figure 9**

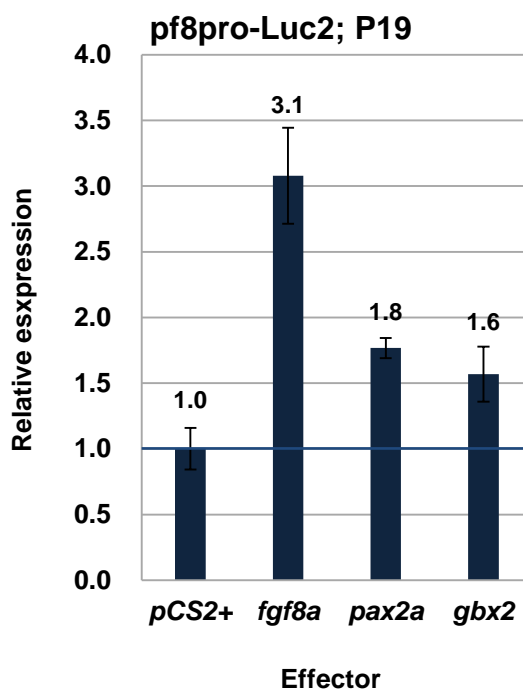
**A**



**B**



**C**



**Figure 10**

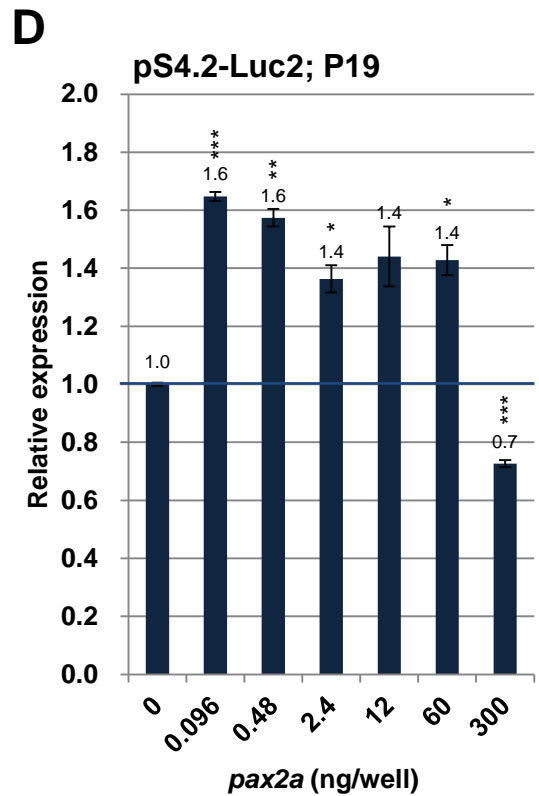
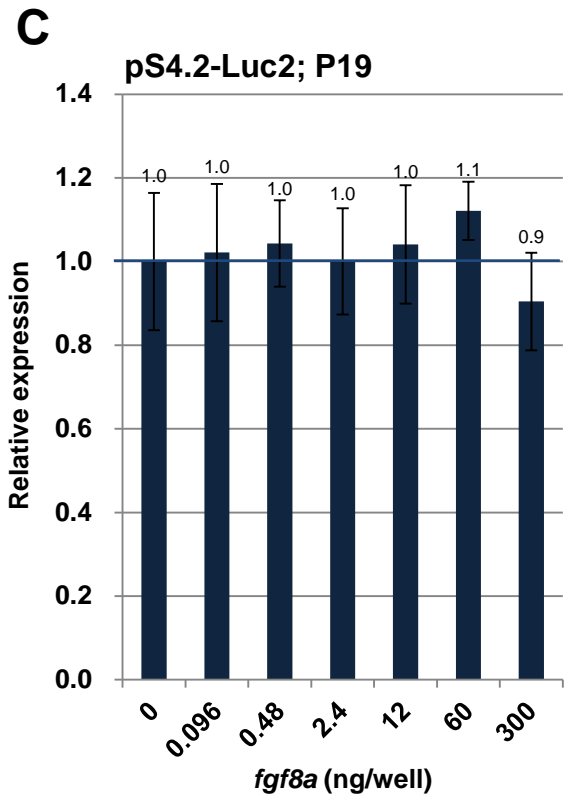
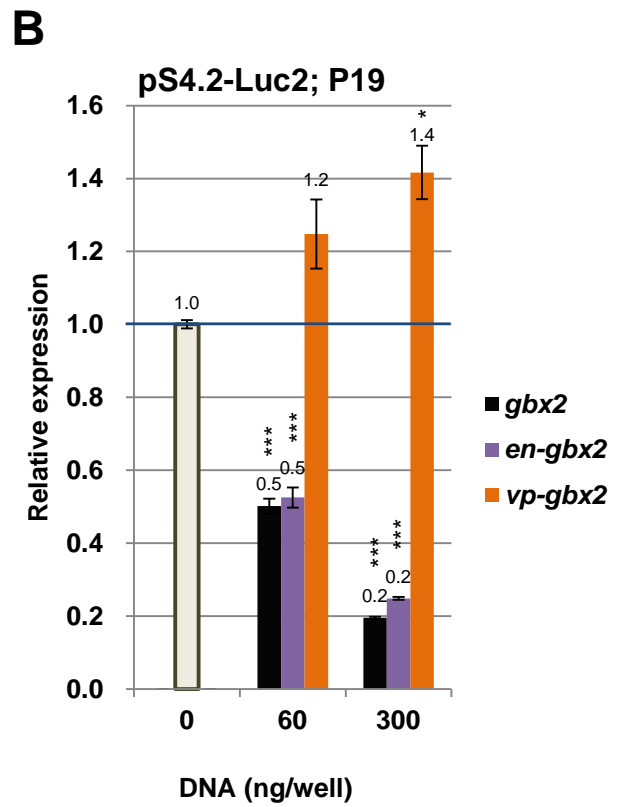
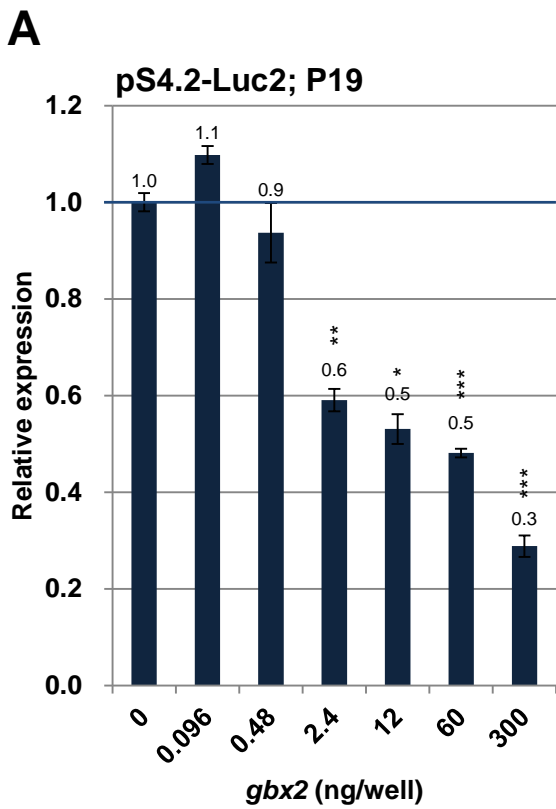
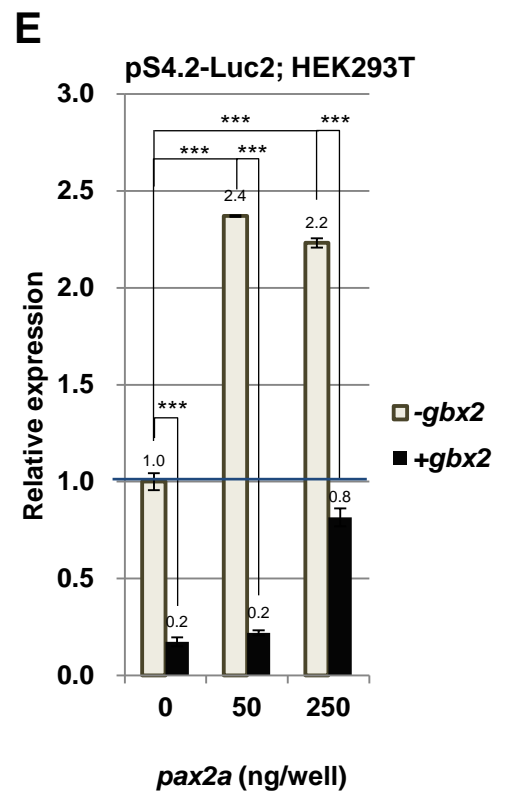
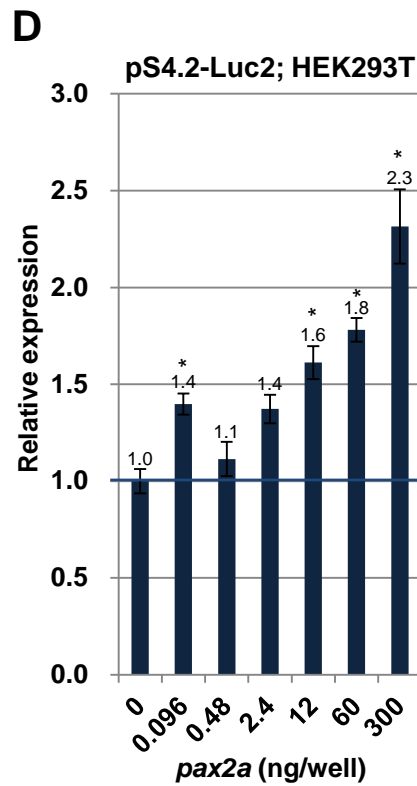
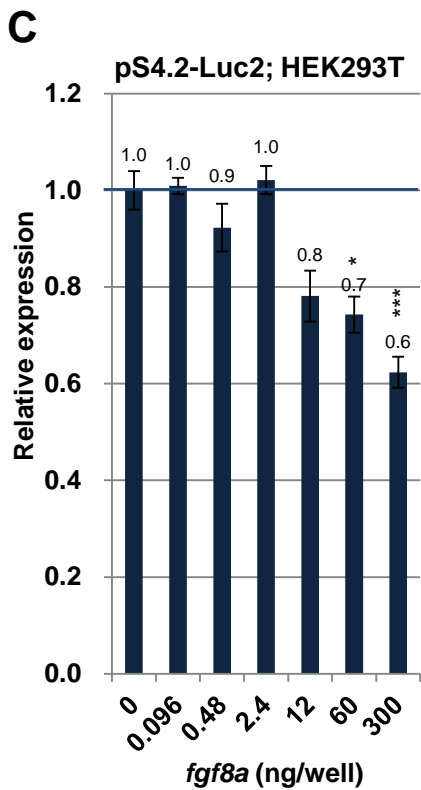
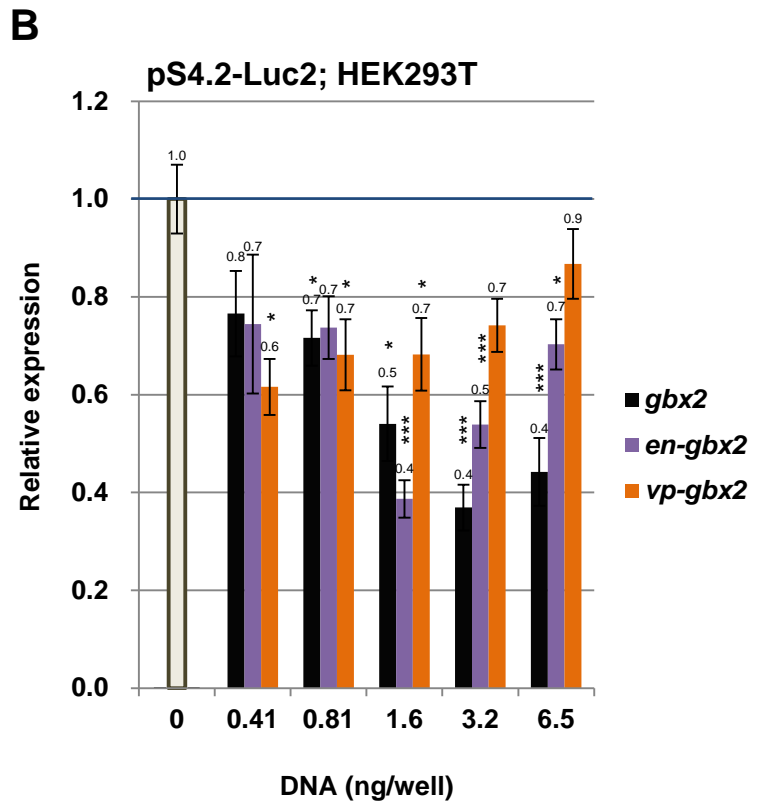
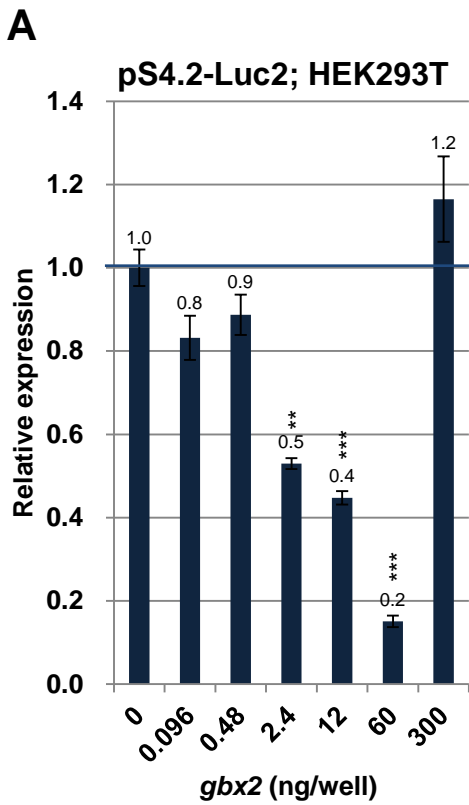
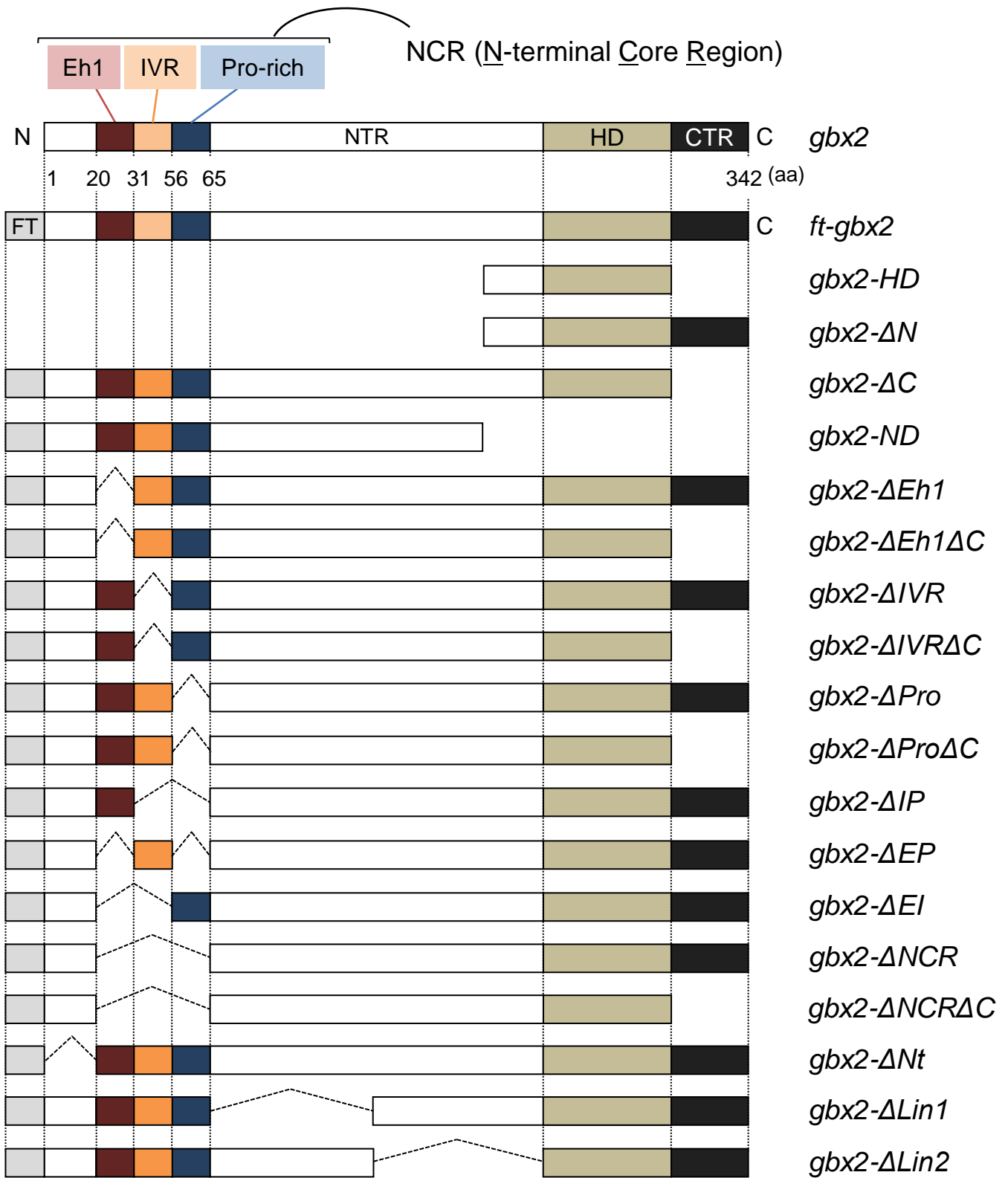


Figure 11



**Figure 12**



**Figure 13**

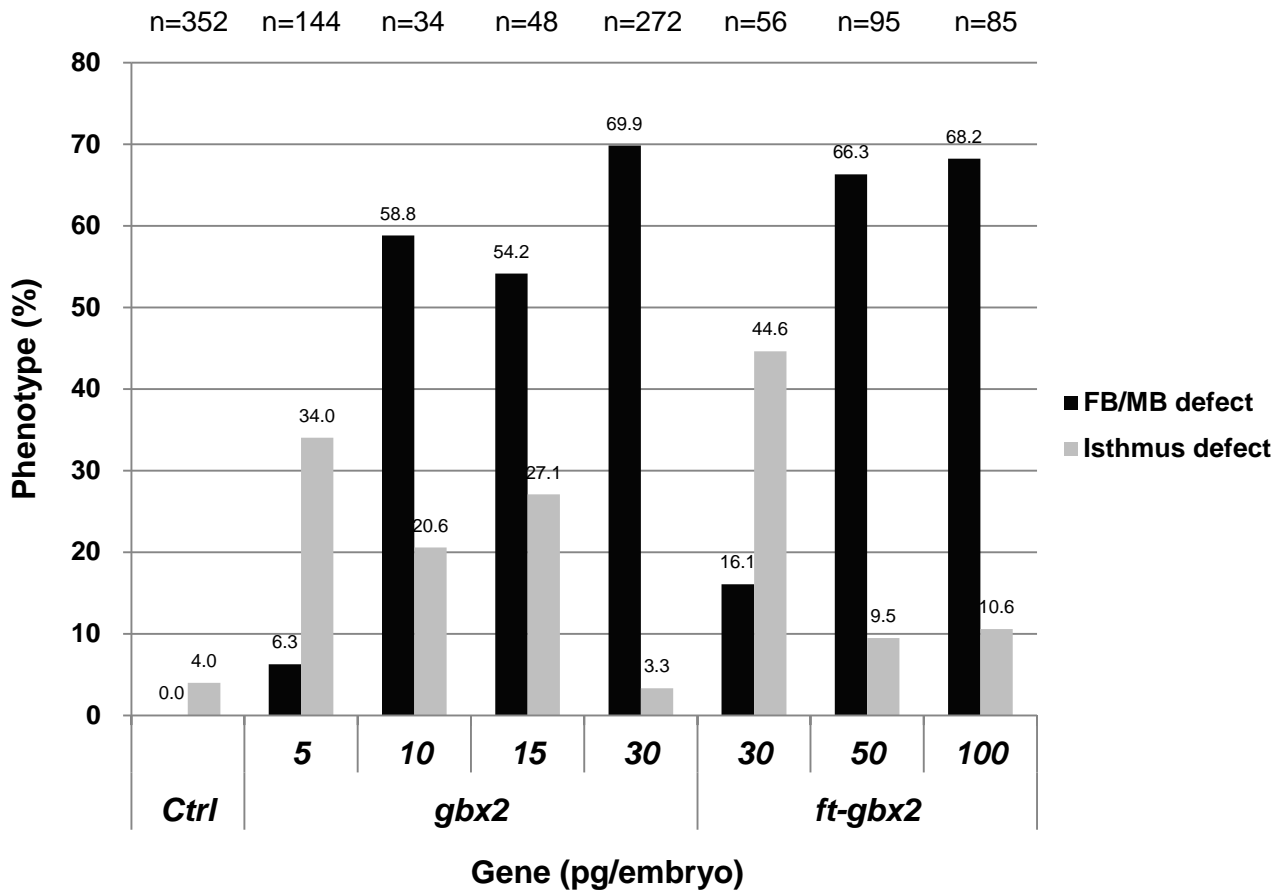
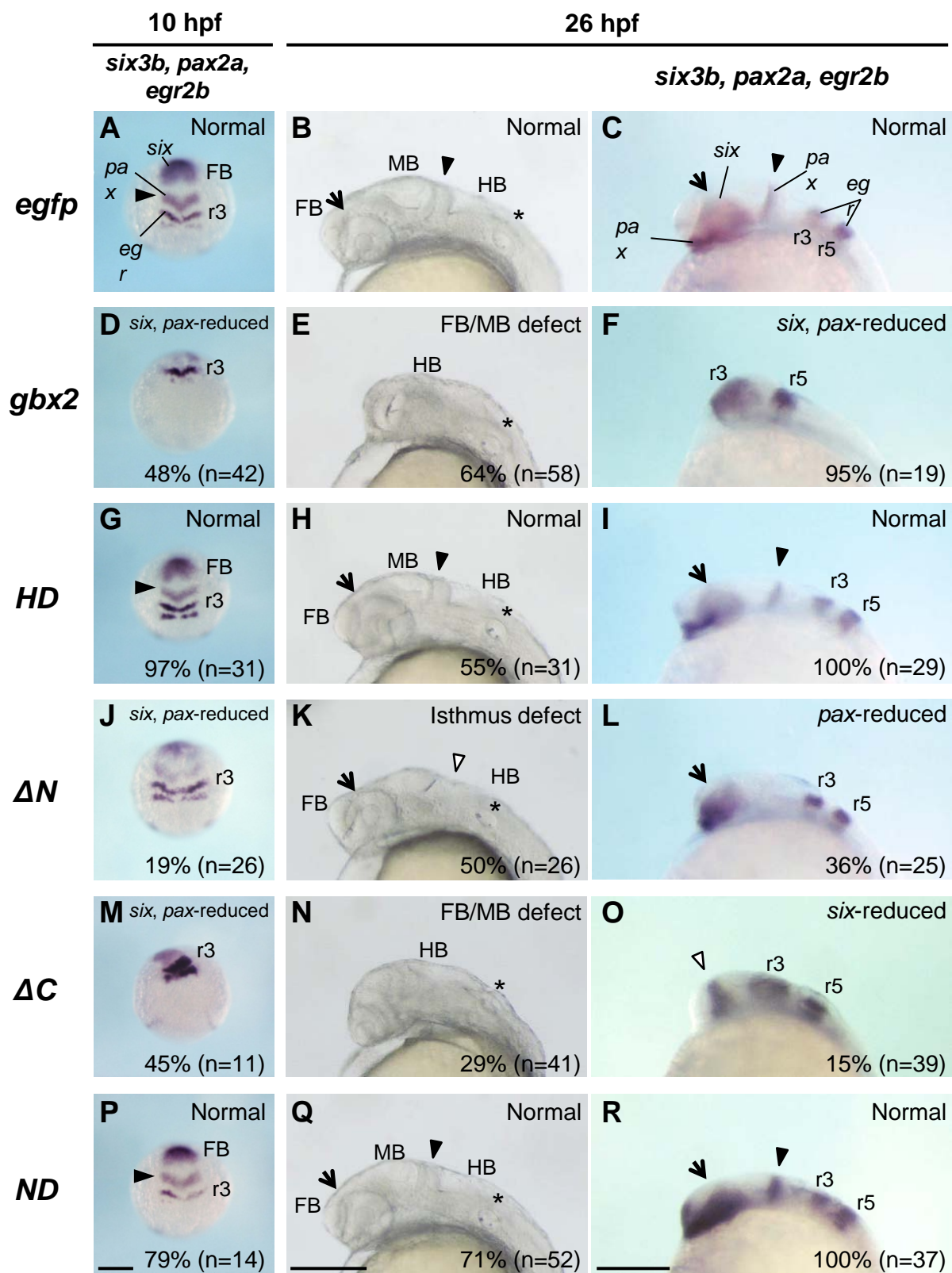


Figure 14



**Figure 15**

F-V--IL: Eh1 Core

**Eh1** **IVR** **Pro**

**zebrafish** MSAAFSTPFMMMQRPVGSTTAFSIDSLIGGPPQSPGHFVYTGYPMFMPYRSVVLPPPPP  
**human** MSAAFPPSLMMMQRPLGSSTAFSIDSLIGSPPQSPGHFVYTGYPMFMPYRPVVLPPPPP  
**mouse** MSAAFPPSLMMMQRPLGSSTAFSIDSLIGSPPQSPGHFVYTGYPMFMPYRPVVLPPPPP  
**xenopus** MSAAFQPPLMMMQRPLGSSTAFSIDSLIGSPPQSPGHFVYTGYPMFMPYRPVVLPPPPP

\*\*\*\*\* ..:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

**CD1**

**zebrafish** PPPPTLPQSA---LPTTHPHHP I PGLPSSFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSSSPSQQ  
**human** PP-PALPQAALQPALPPAHPHHQIPSLPTGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASPQHQ  
**mouse** PP-PALPQAALQPALPPAHPHHQIPSLPTGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASPQHQ  
**xenopus** PP-PSLSQAT---LPSAHPHHQIPSLPSGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASTQHQ

\*\* \*:\*.\*: : \*\*.:\*\*\* \*\*.\*: .\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*.:.\*

**CD2**

**zebrafish** HQDAARKLGSQSIHA--MFDKSDIRLDGEDG-KTFATKDSTSIPSFHDSQSVH---TST  
**human** EAAAARKFAPQPLPGGGNFDKAEALQADAEDG-KGFLAKEGS-LLAFSAAETVQASLVGA  
**mouse** EAAAARKFAPQPLPGGGNFDKAEALQADAEDG-KAFLAKEGS-LLAFSAAEAVQASLVGA  
**xenopus** EAA--RKFGAQLHG--AFEKSDGSQSDGEDGNKTYITKEGT-LLPFSTSEAS----LGP

. \*\*:.\*. : . \*::: : \*.\*\*\* \* : :::: : . \* :: : ..

**zebrafish** VRGHSKDDSK-EDDCHRKDESFMSDDL DYSSDDNPGNAMCQKEDGDGSGGLDDGVHGG  
**human** VRGQKDESKVEDDPKGKEEFSLESDVDYSSDDNLTGQAAHKEEDP--GHAEETPPSS  
**mouse** VRGQKDESKVEDDPKGKEEFSLESDVDYSSDDNLPQTAKHEEDP--GHAEETPQSG  
**xenopus** VRGQKKEESGKEAEGKGEDSYLMSDDL DYSSDDNISCQTAKHEED-----TPEESPNS

\*\*\*:.\*:\* \* : : \*::: : \*\*\*\*\* . : : : \* : : ..

**Homeodomain**

**zebrafish** NGAG--NTTSTGKNRRRRTAFTSEQLLELEKEFEHCKKYL SLTERSQIAHALKLSEVQVKI  
**human** GAAG--STTSTGKNRRRRTAFTSEQLLELEKEFEHCKKYL SLTERSQIAHALKLSEVQVKI  
**mouse** GAAG--STTSTGKNRRRRTAFTSEQLLELEKEFEHCKKYL SLTERSQIAHALKLSEVQVKI  
**xenopus** NPSNNSNTSSTGKNRRRRTAFTSEQLLELEKEFEHCKKYL SLTERSQIAHALKLSEVQVKI

. : . .\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

**CD3**

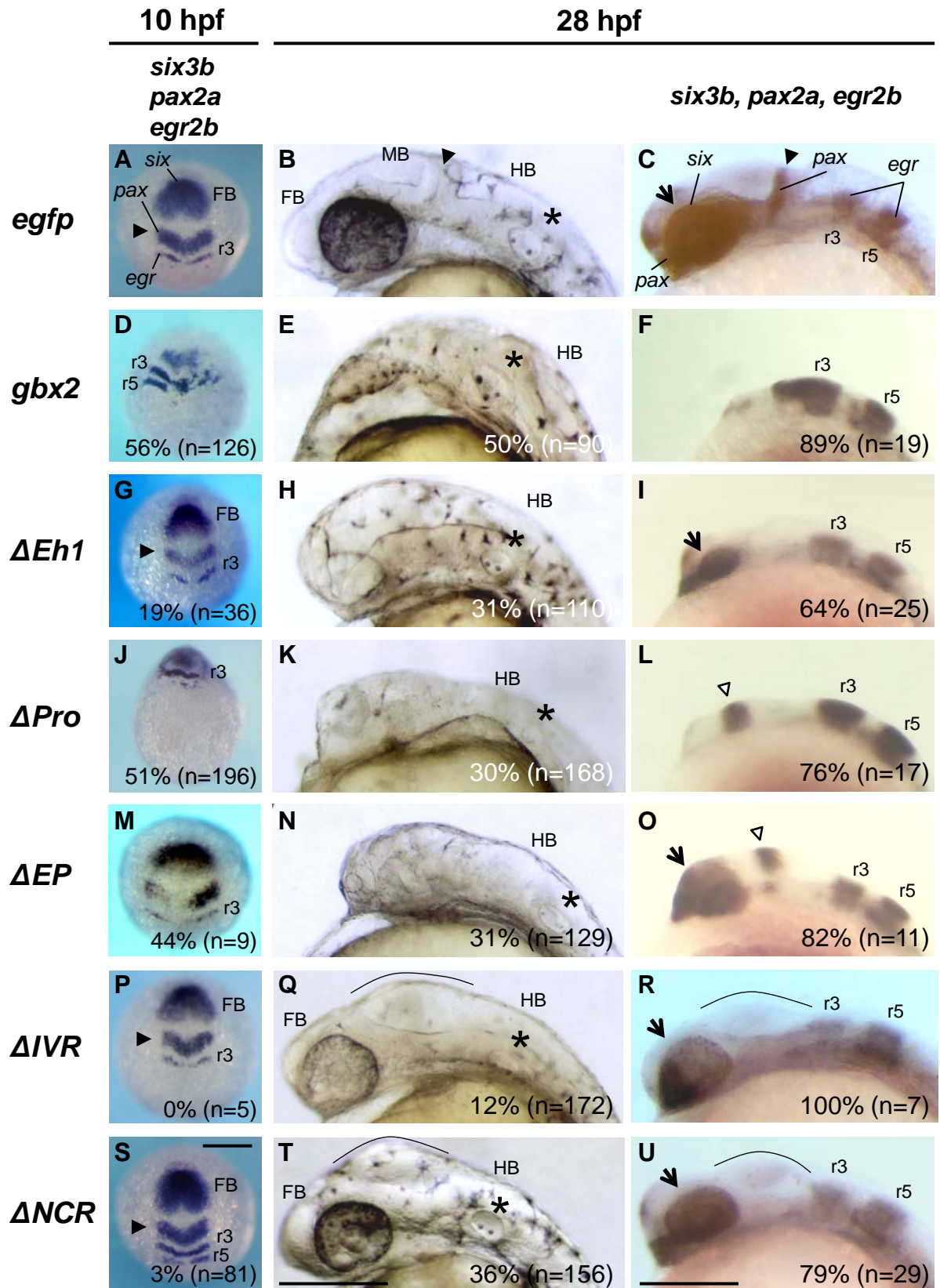
**zebrafish** WFQNRRAKWKRVKAGNVNSKTGEP SRNPKIVVPIPVHVS RFAIRSQHQQLEQARP  
**human** WFQNRRAKWKRVKAGNANSKTGEP SRNPKIVVPIPVHVS RFAIRSQHQQLEQARP  
**mouse** WFQNRRAKWKRVKAGNANSKTGEP SRNPKIVVPIPVHVS RFAIRSQHQQLEQARP  
**xenopus** WFQNRRAKWKRVKAGNANSKTGEP SRNPKIVVPIPVHVS RFAIRSQHQQLEQTRP

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*

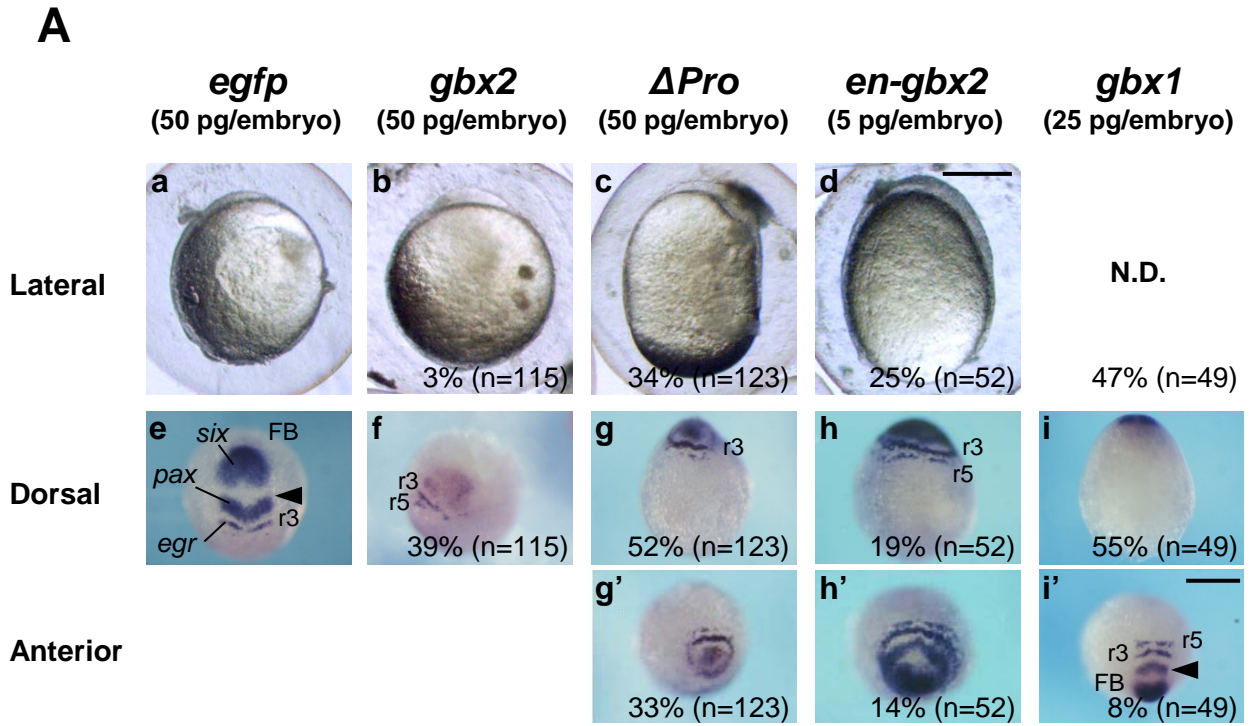
**CD4**

Figure 16

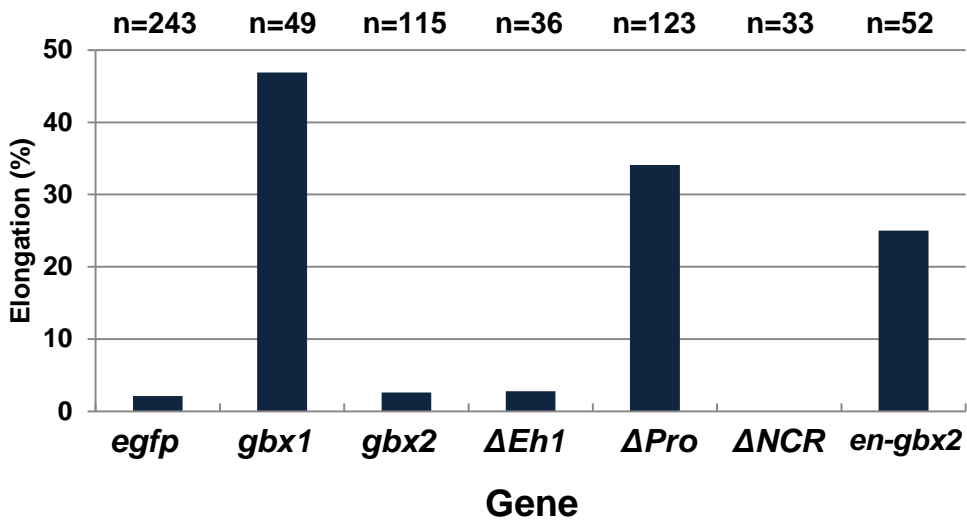




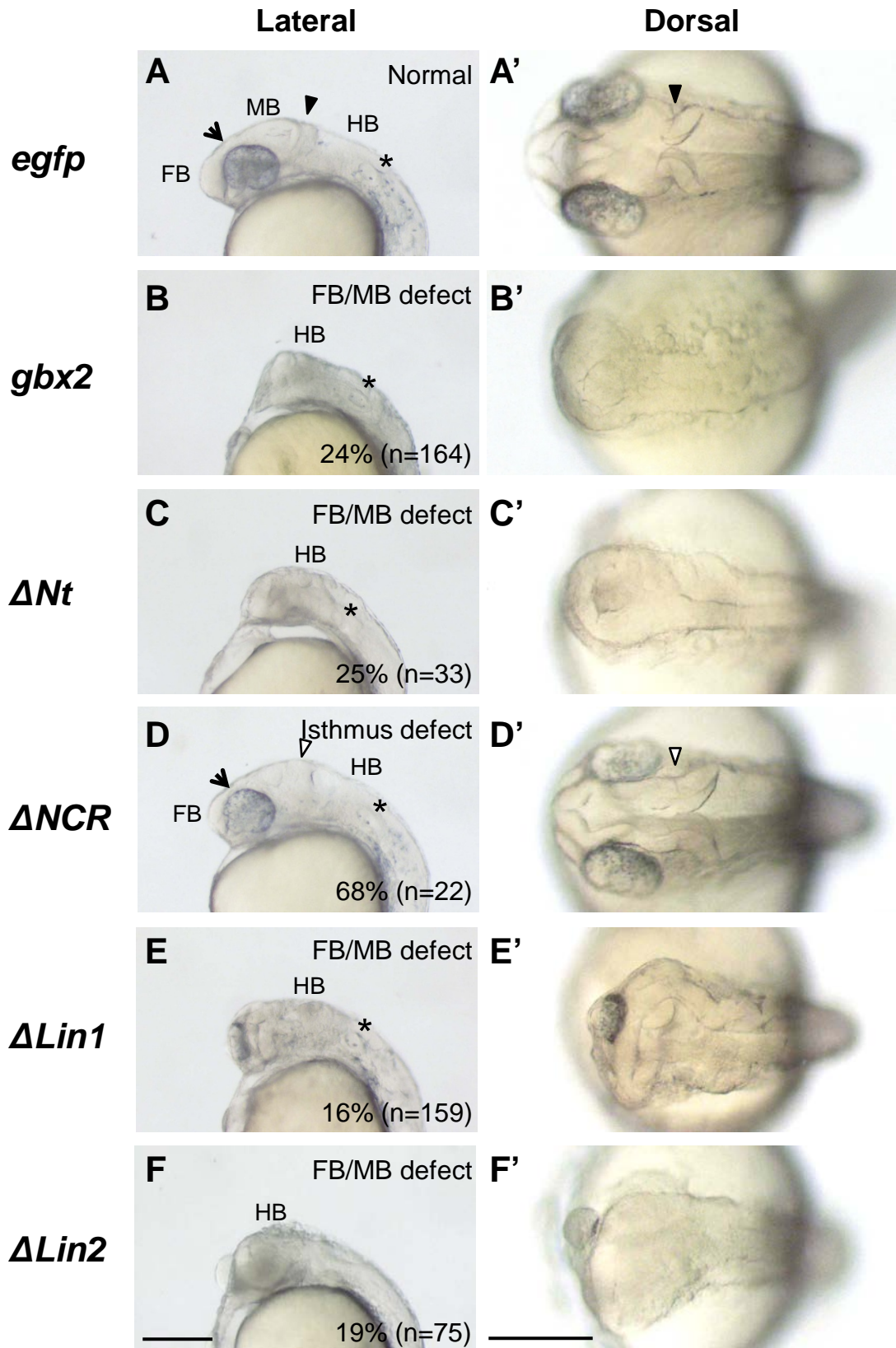
**Figure 17**



**B**

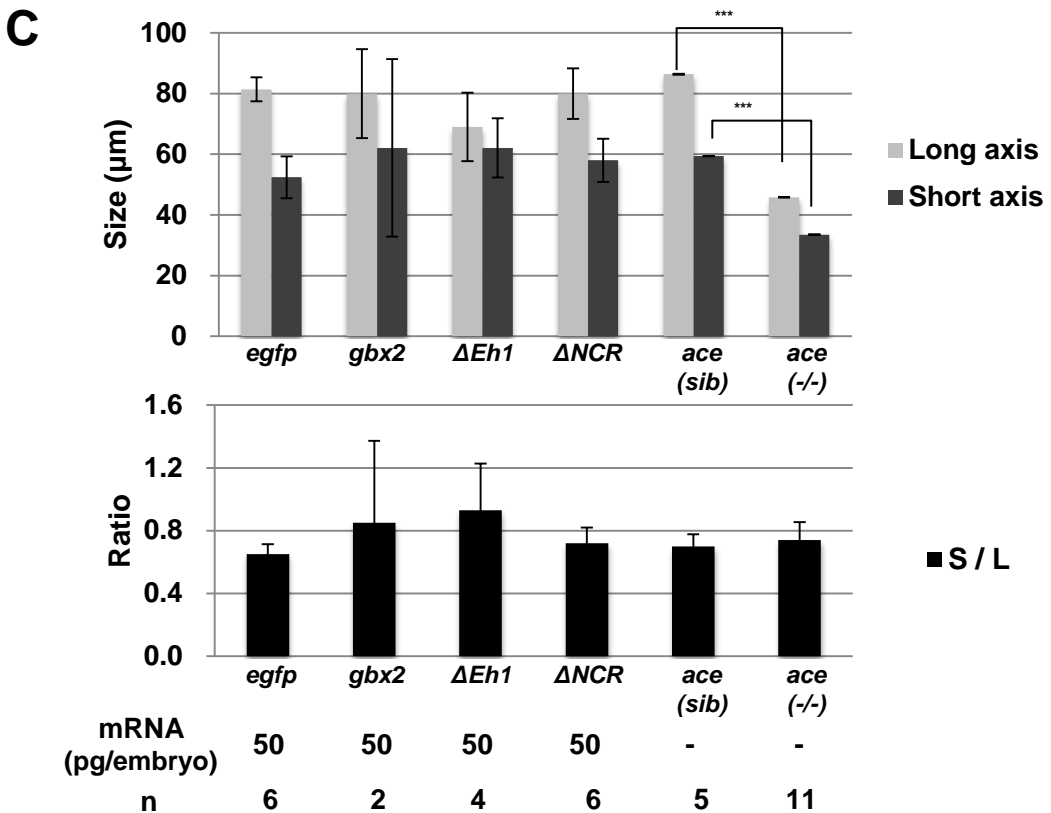
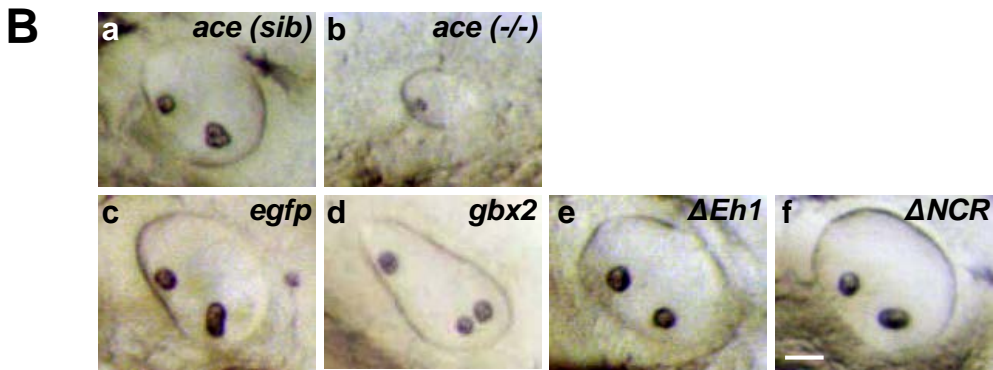
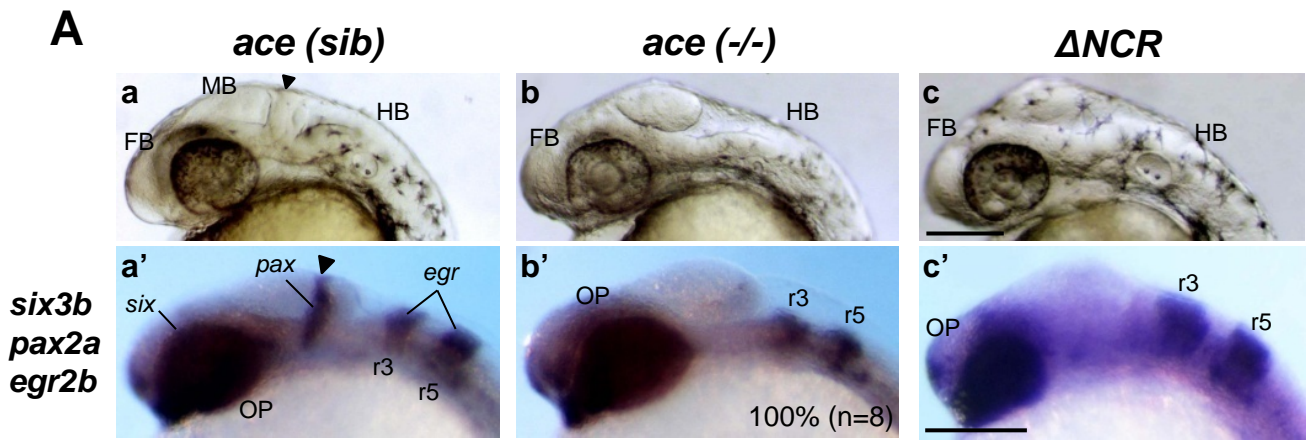


**Figure 18**

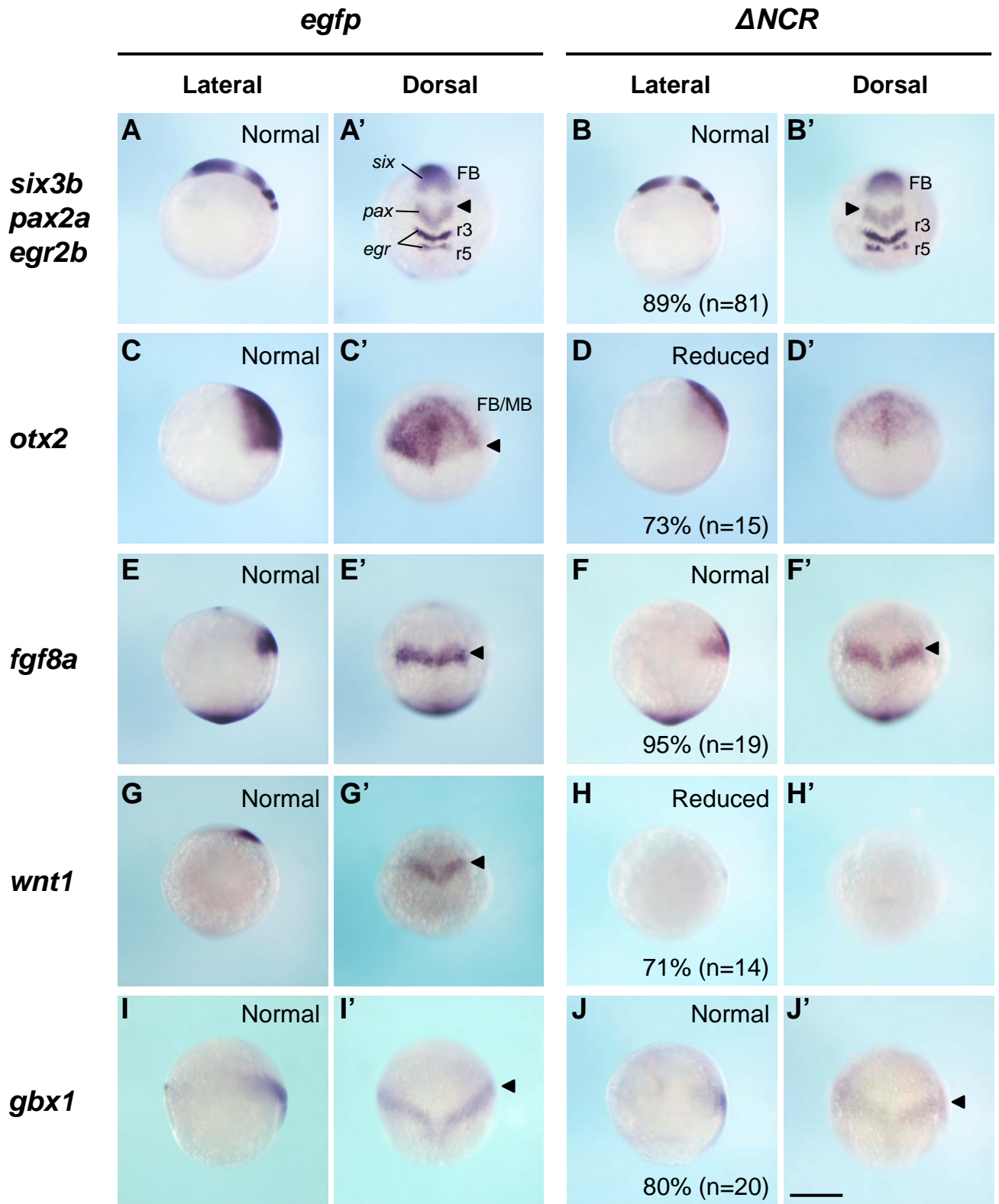


**Figure 19**

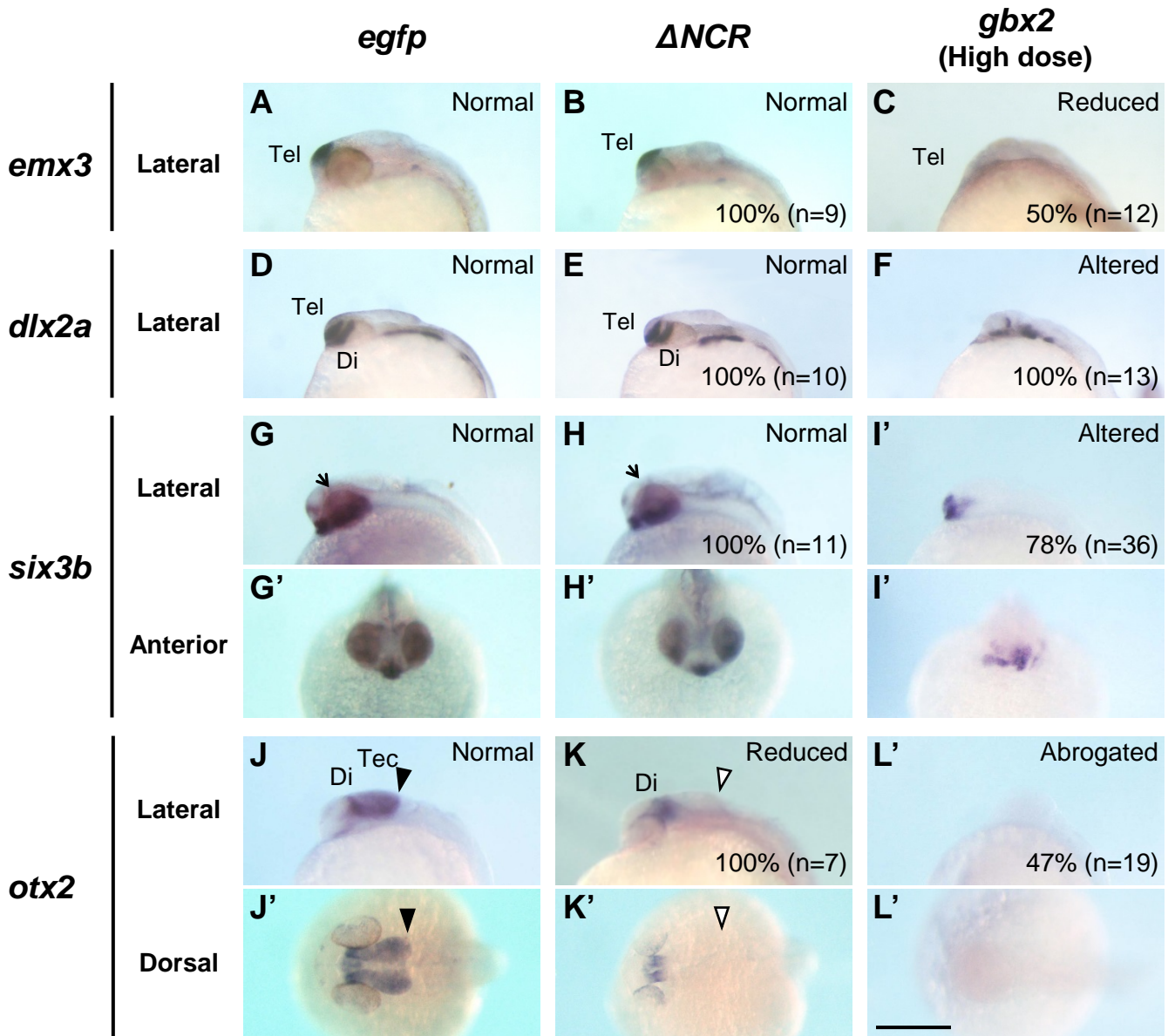




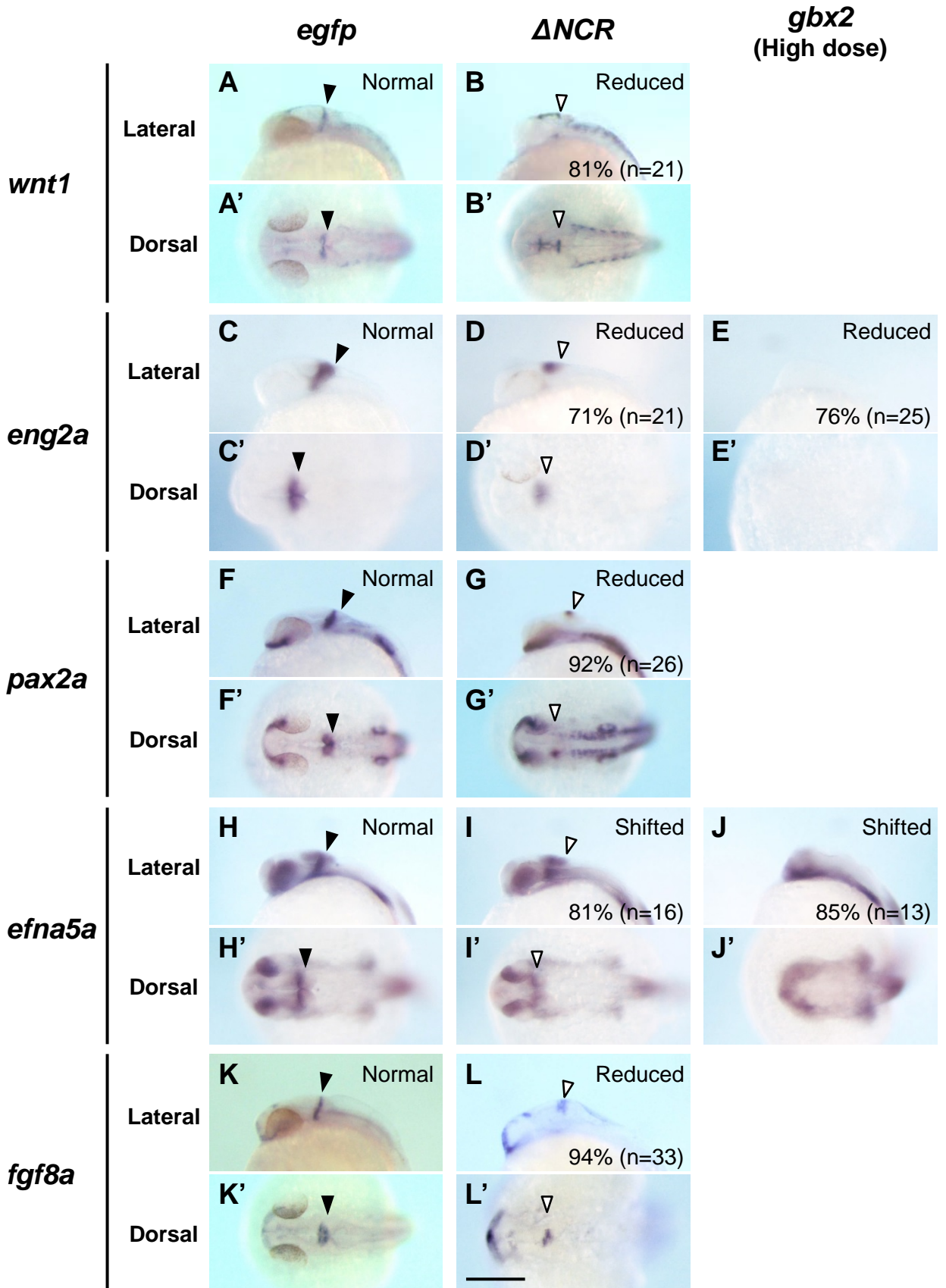
**Figure 20**



**Figure 21**

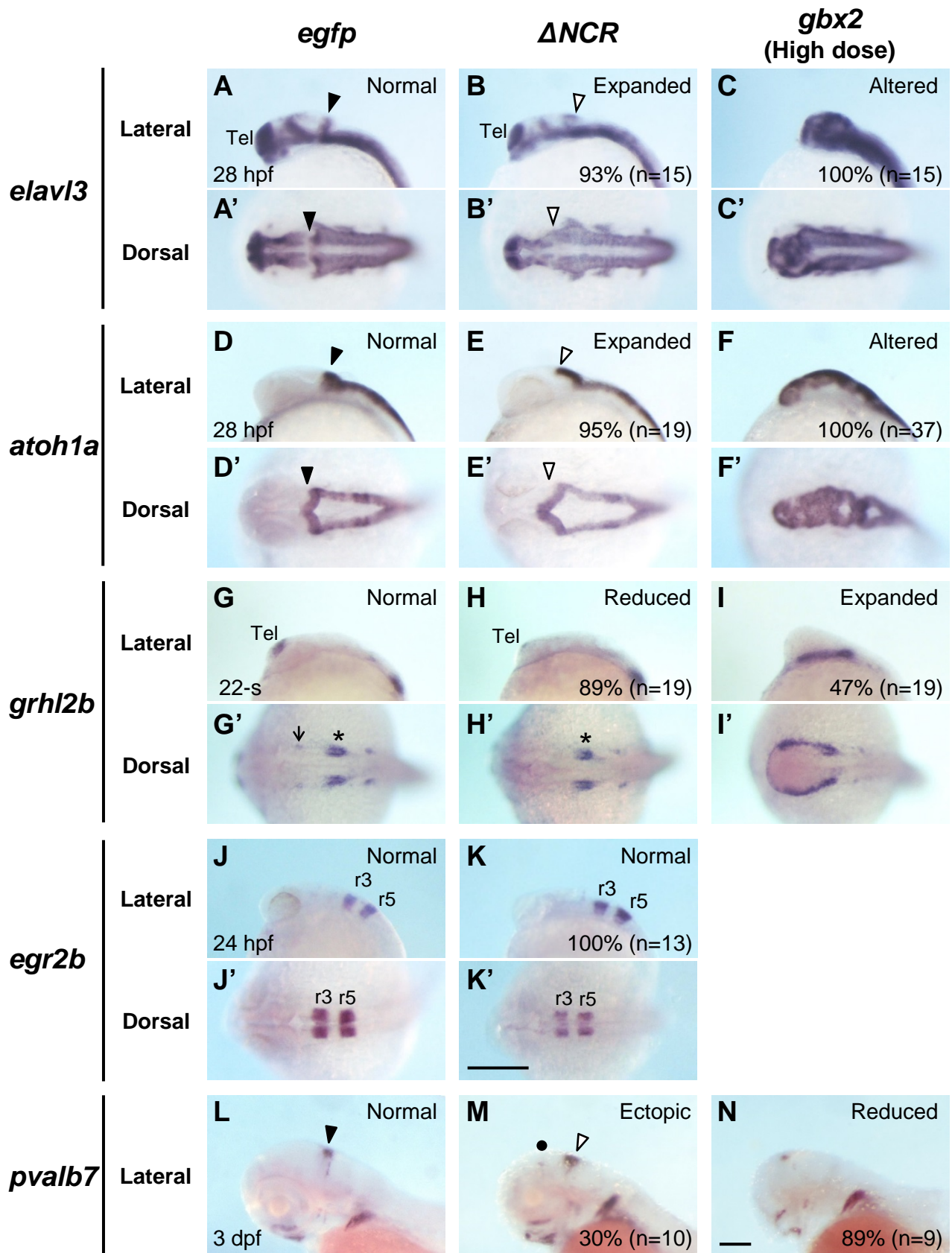


**Figure 22**



**Figure 23**





**Figure 24**



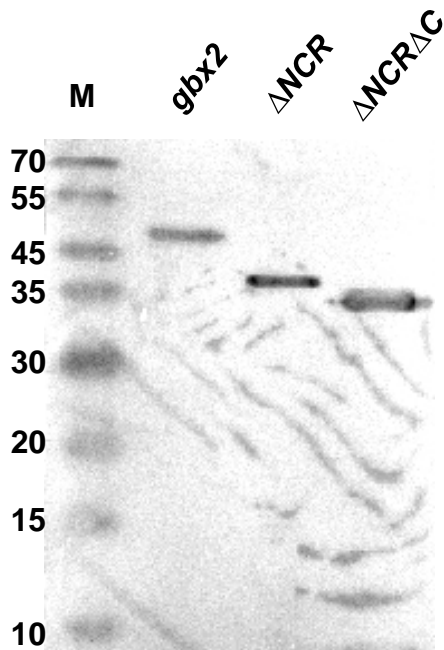
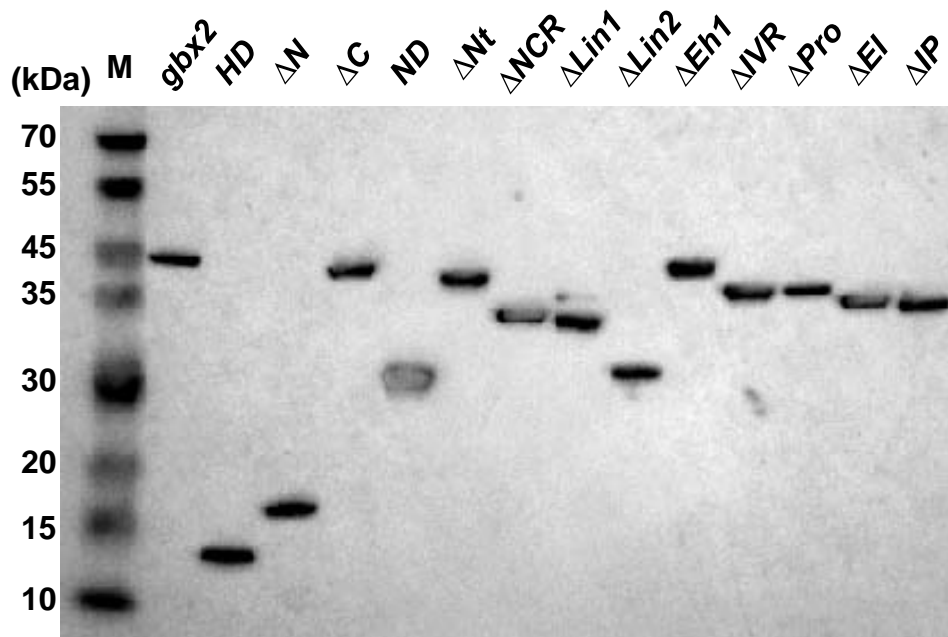
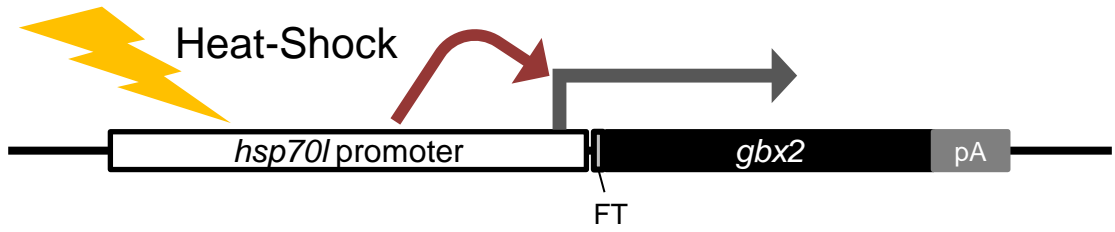
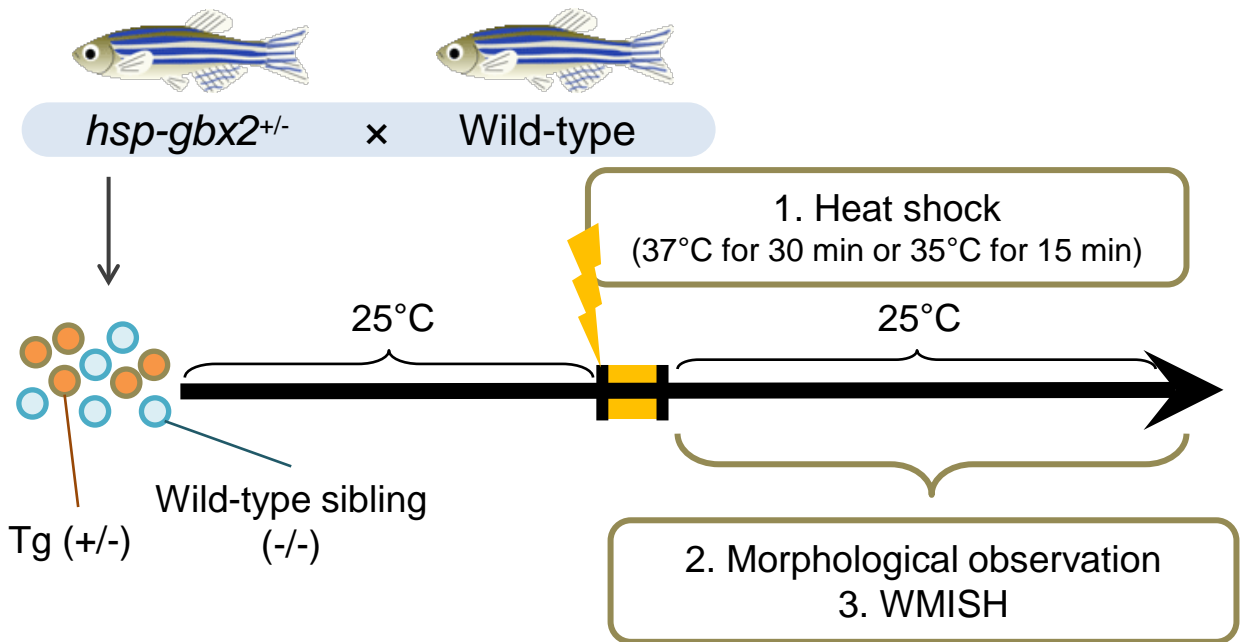
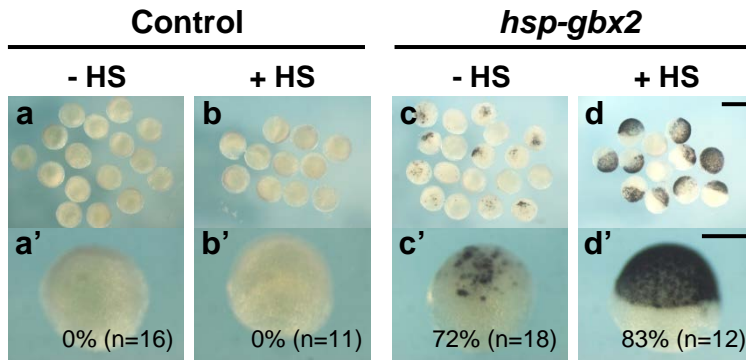
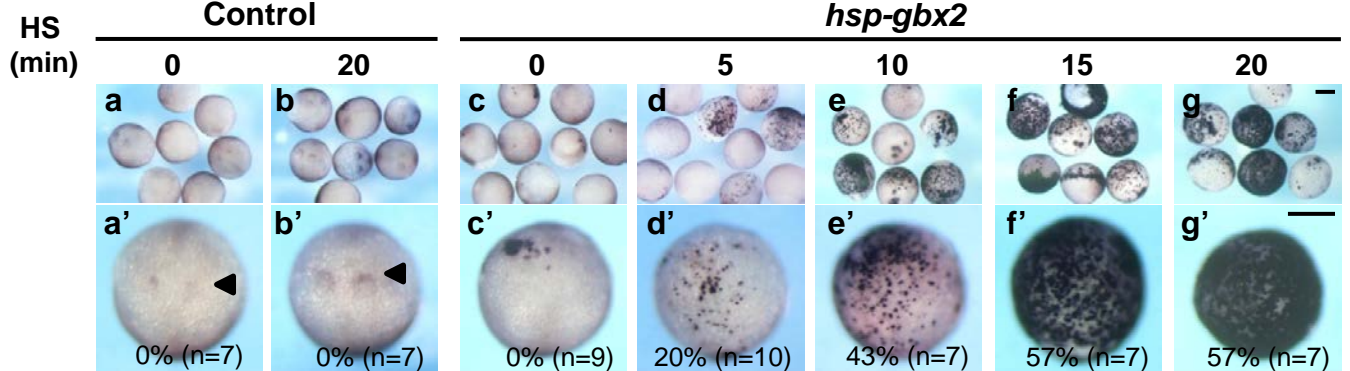
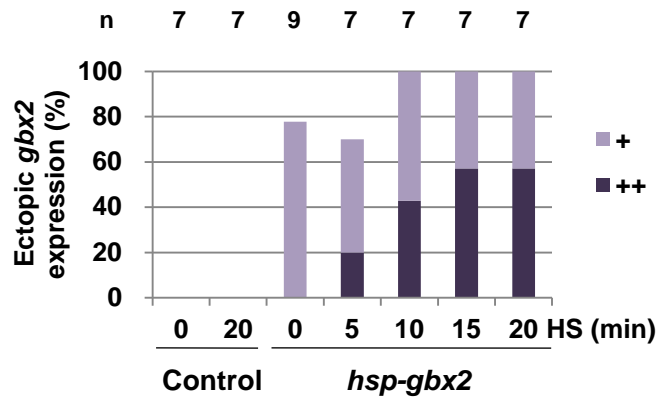
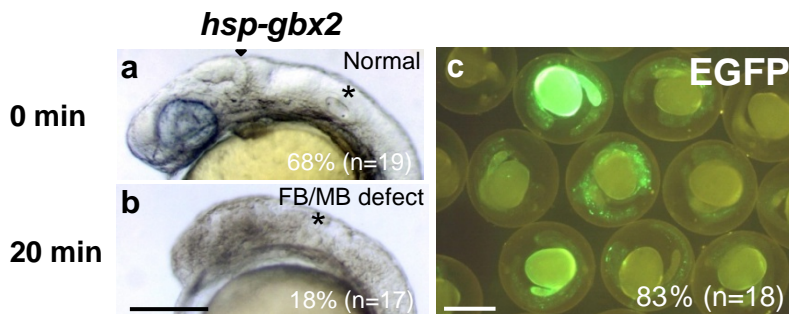
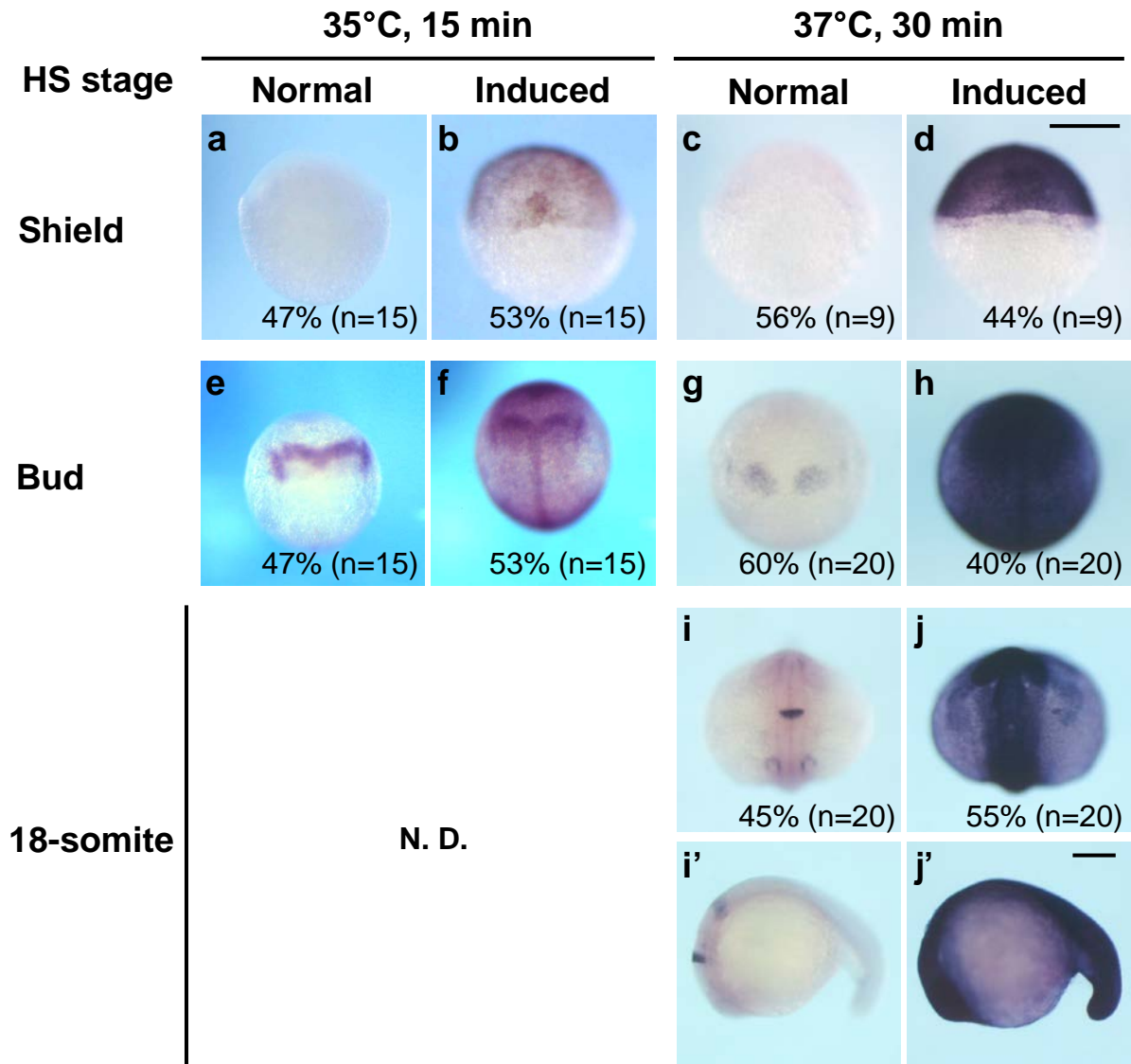


Figure 25

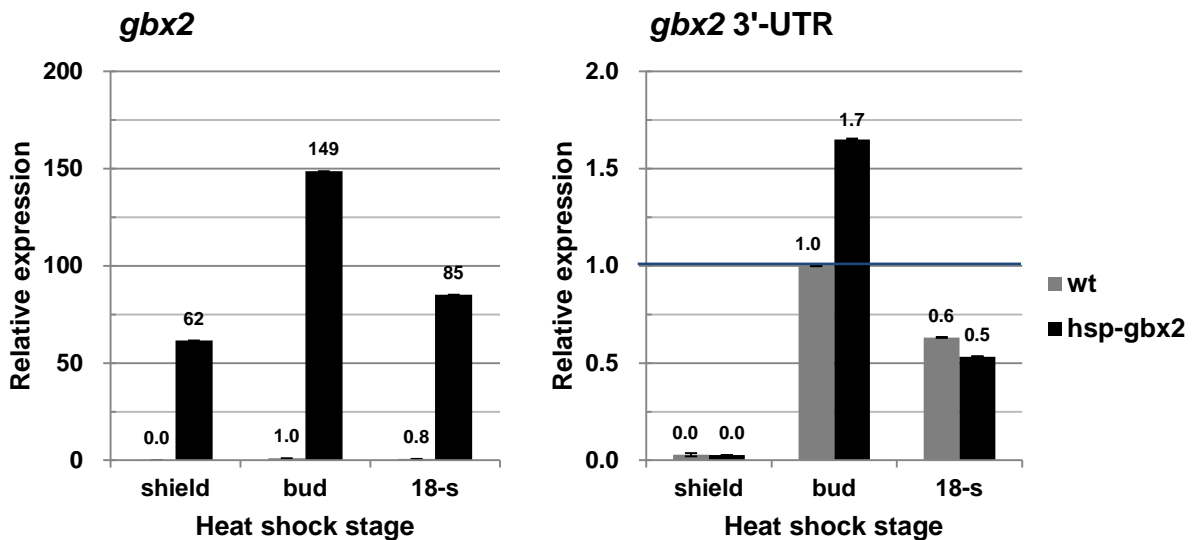
**A****B****Figure 26**

**A****B****h****C****Figure 27**

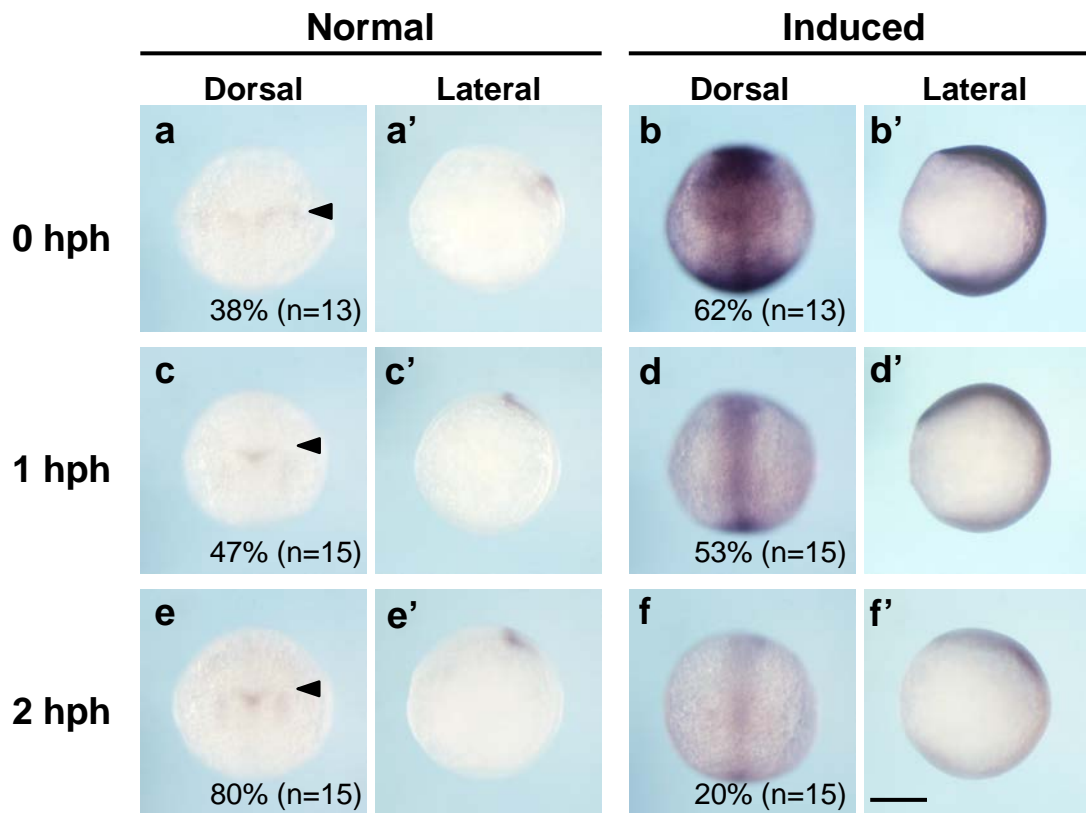
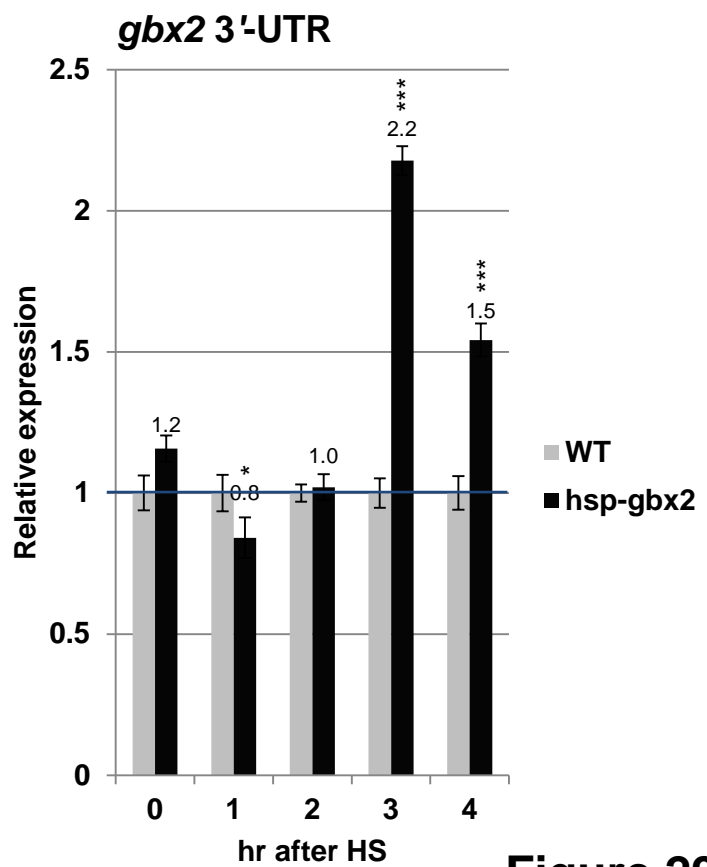
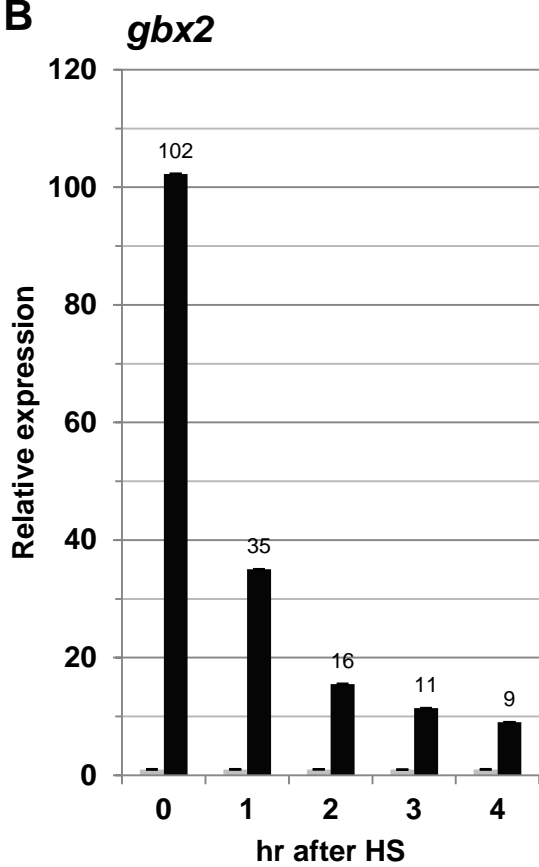
**A**

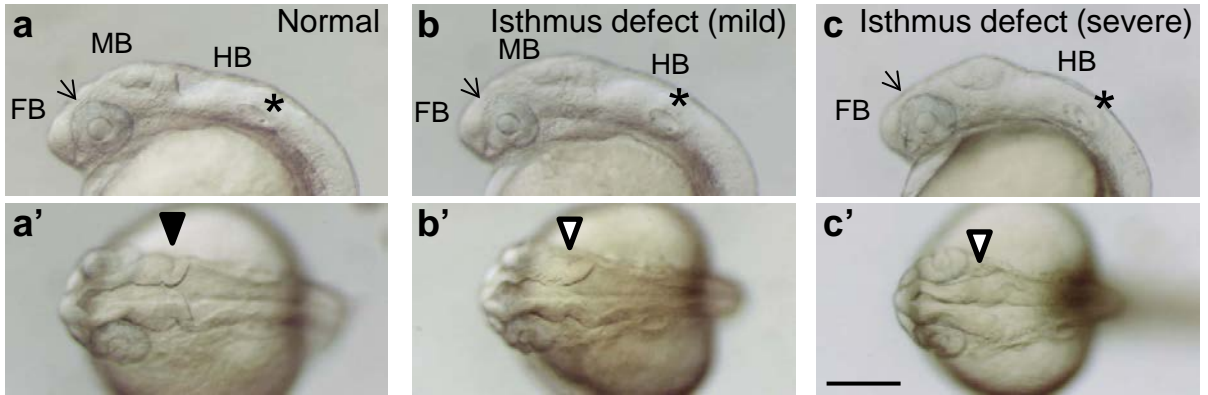
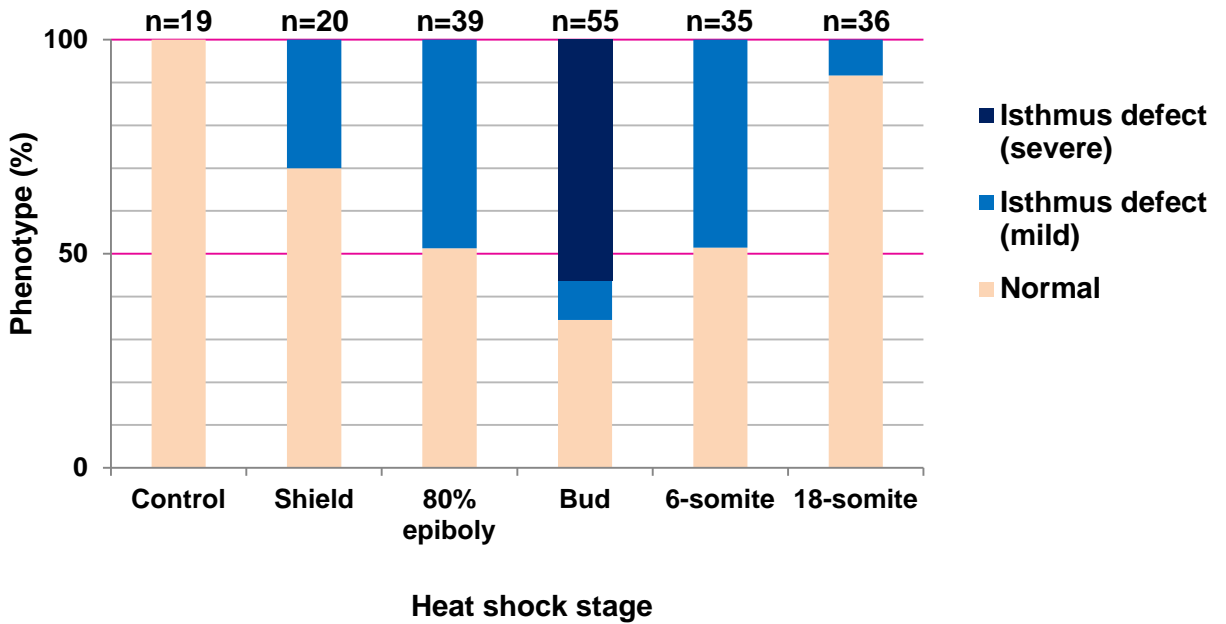


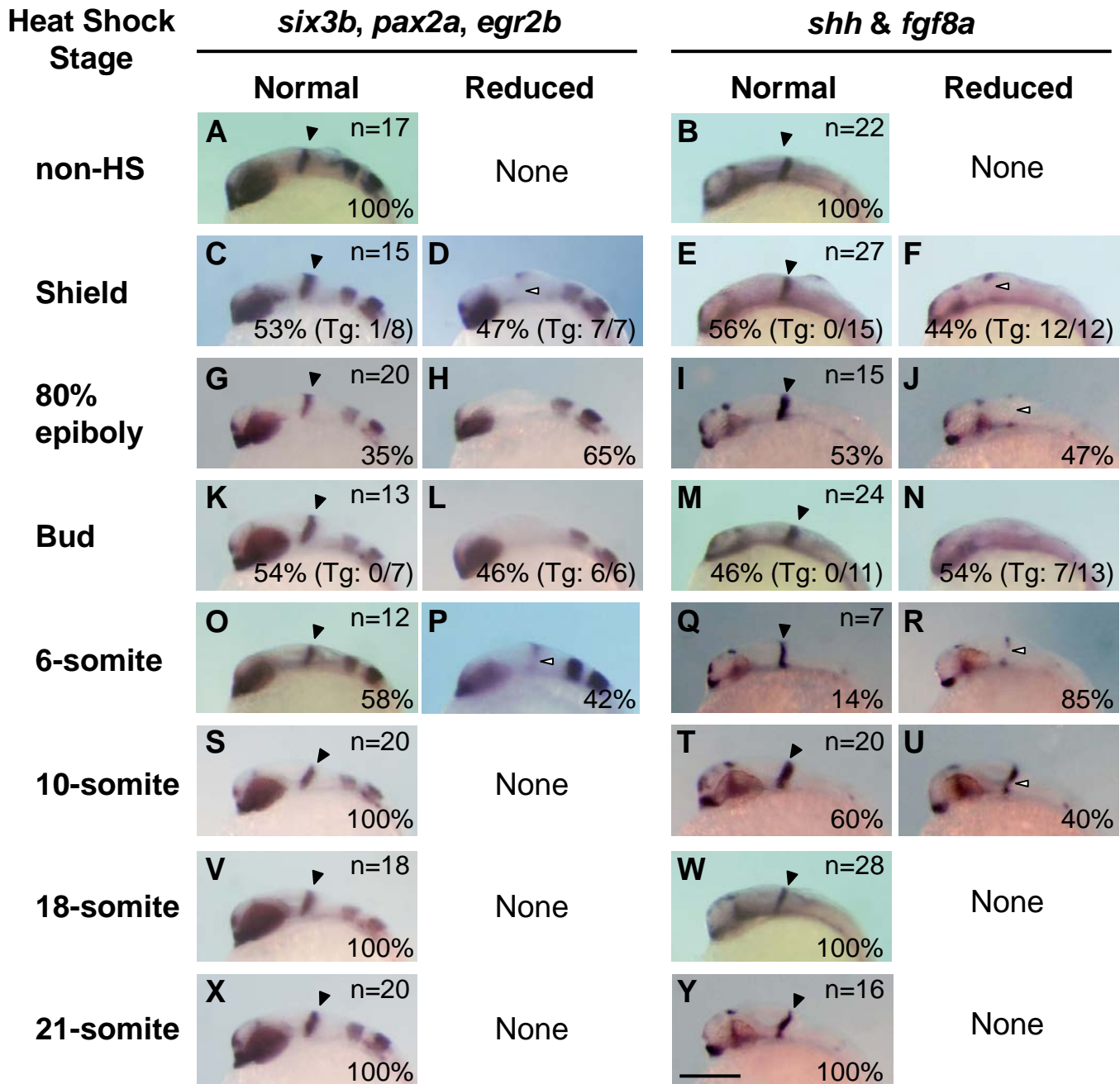
**B**



**Figure 28**

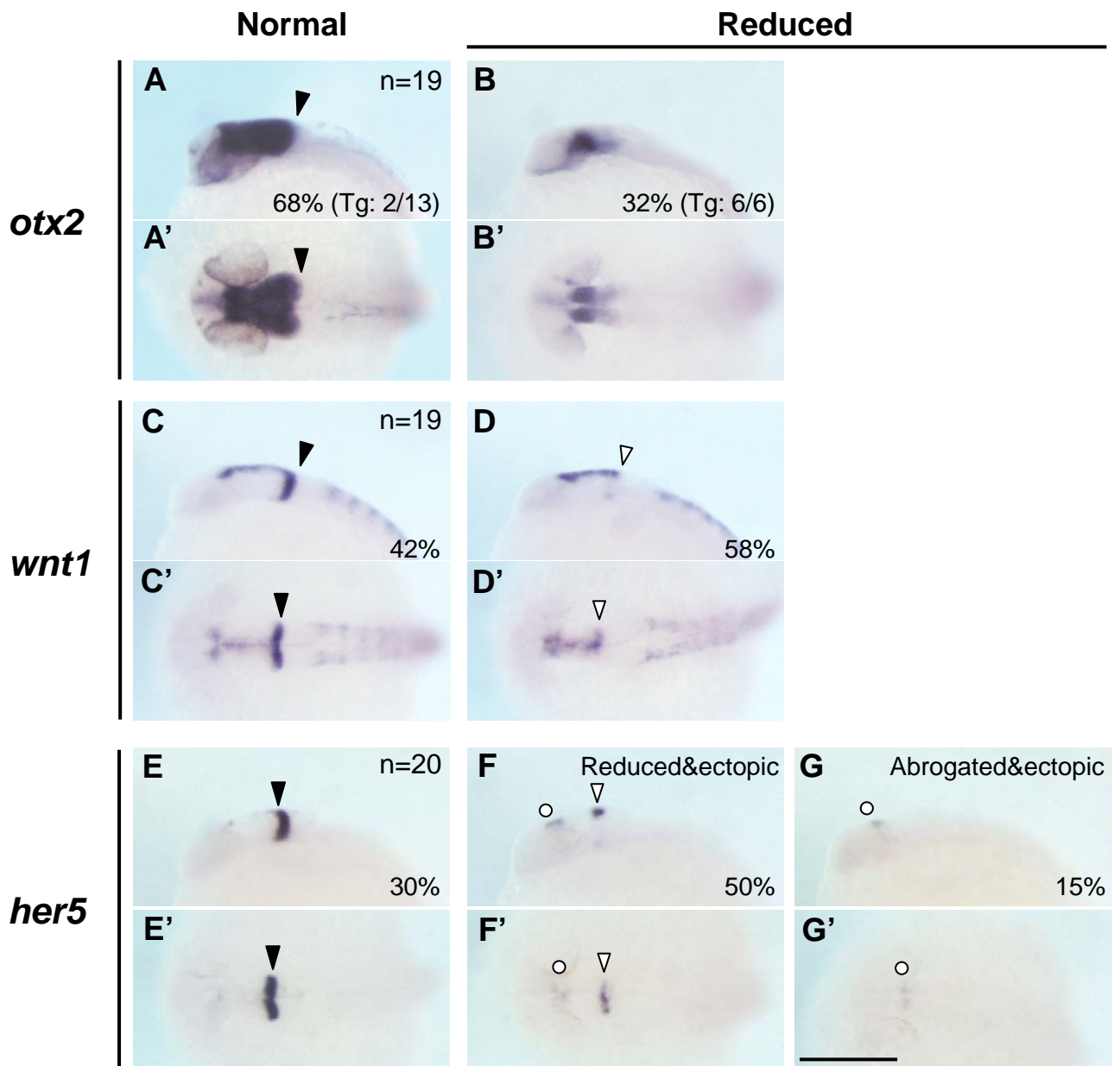
**A****B****Figure 29**

**A****B****Figure 30**



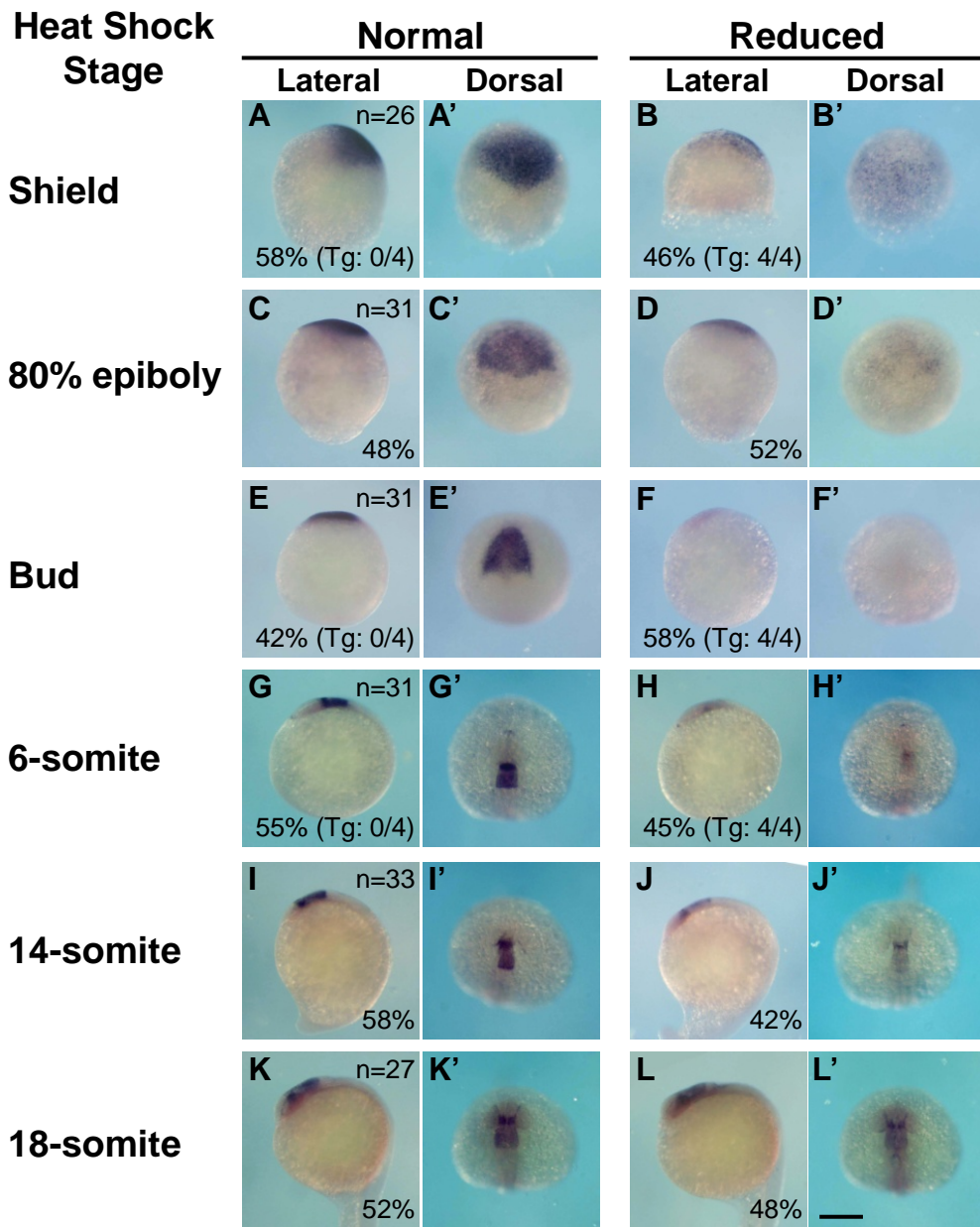
**Figure 31**



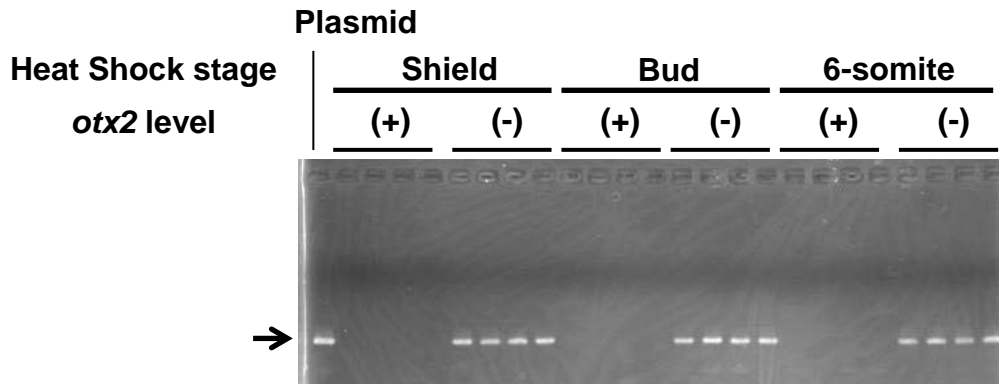


**Figure 32**

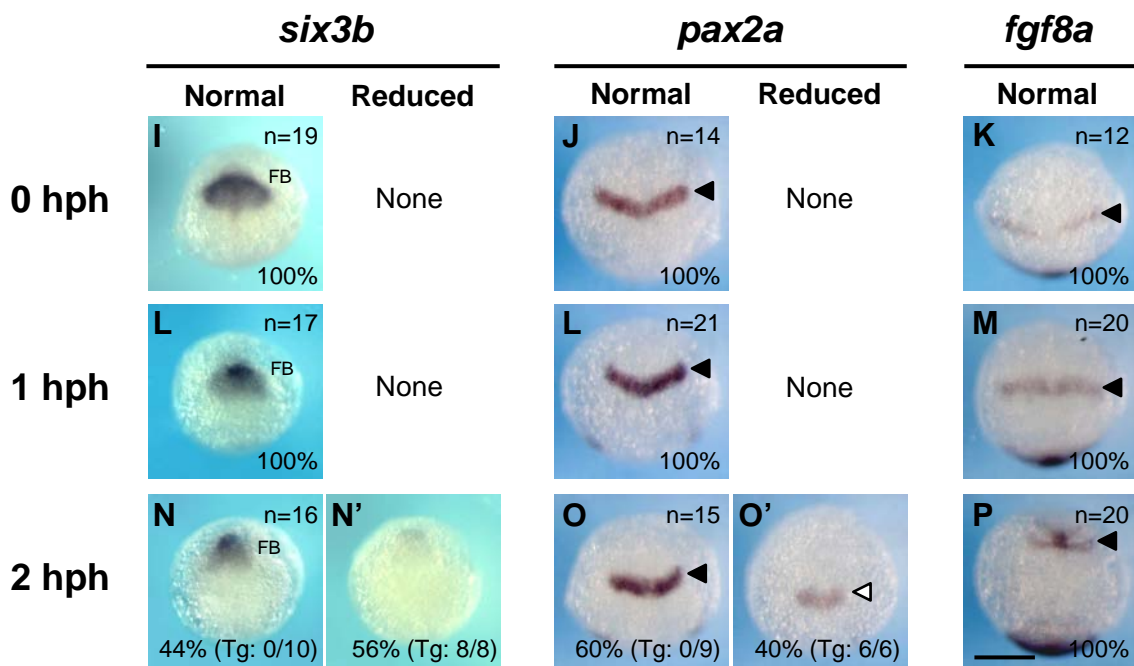
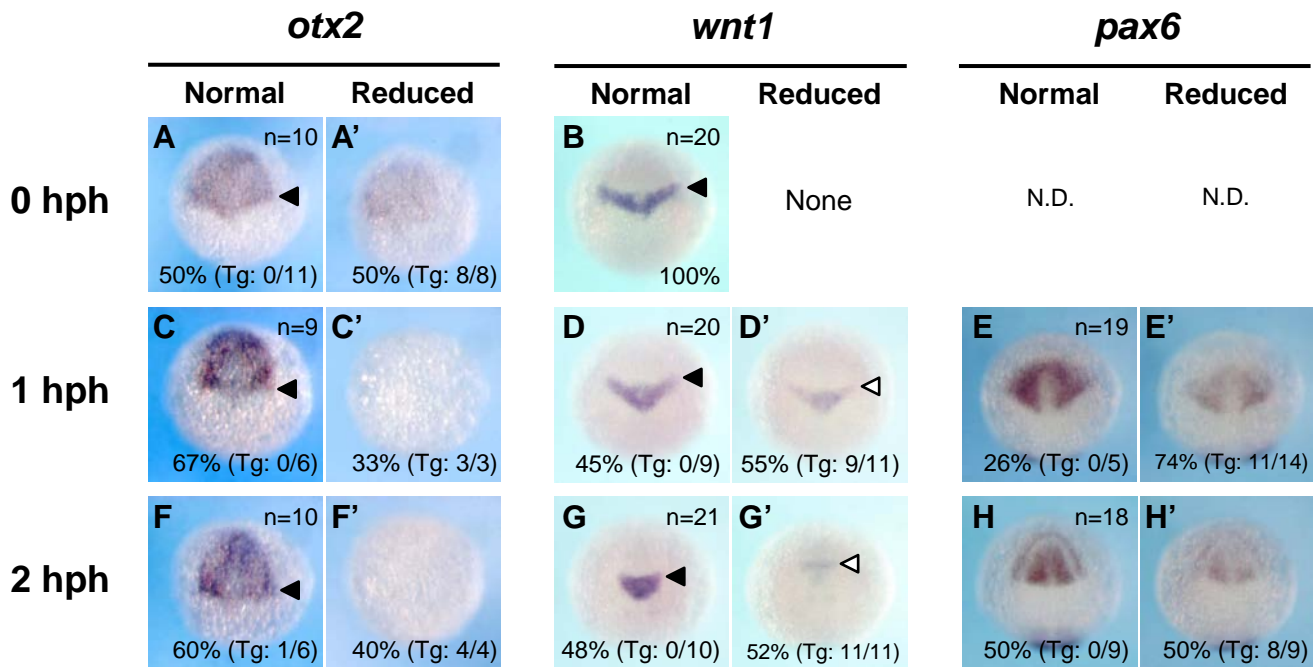




**M**

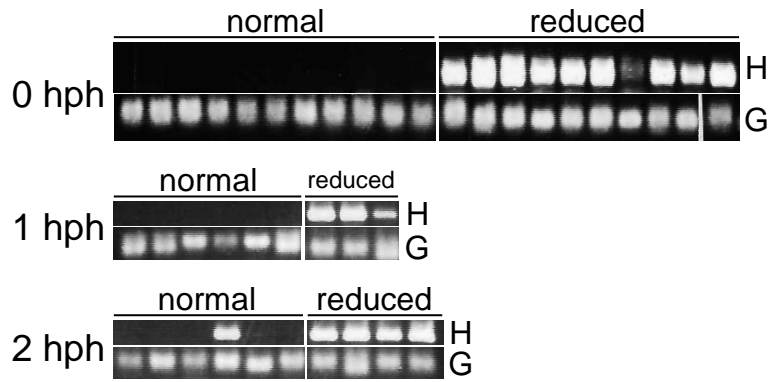


**Figure 33**

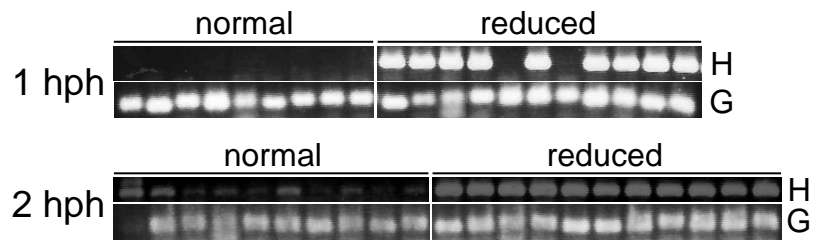


**Figure 34**

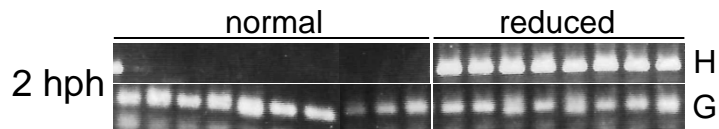
*otx2*



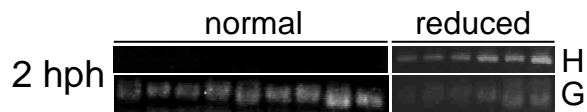
*wnt1*

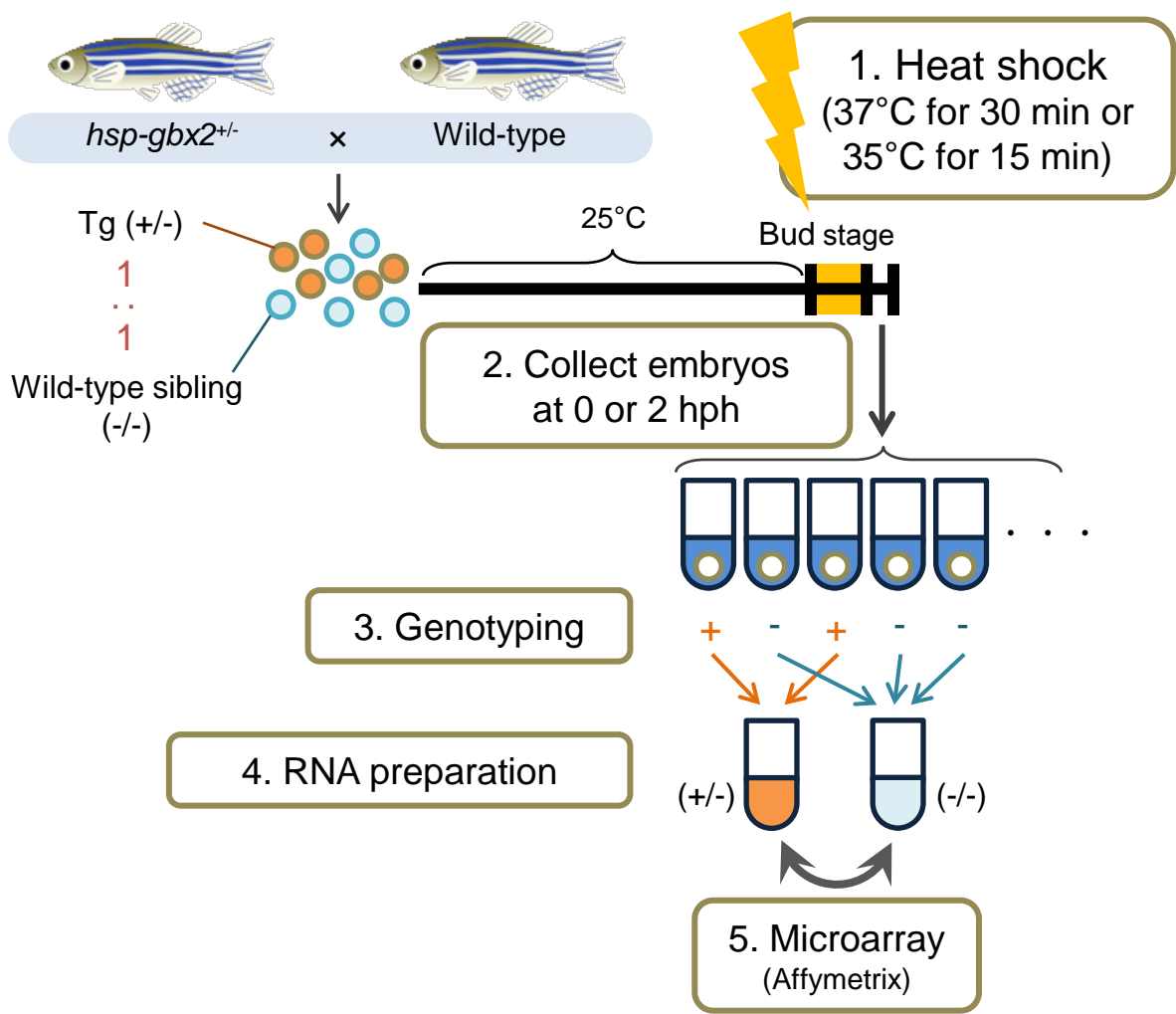
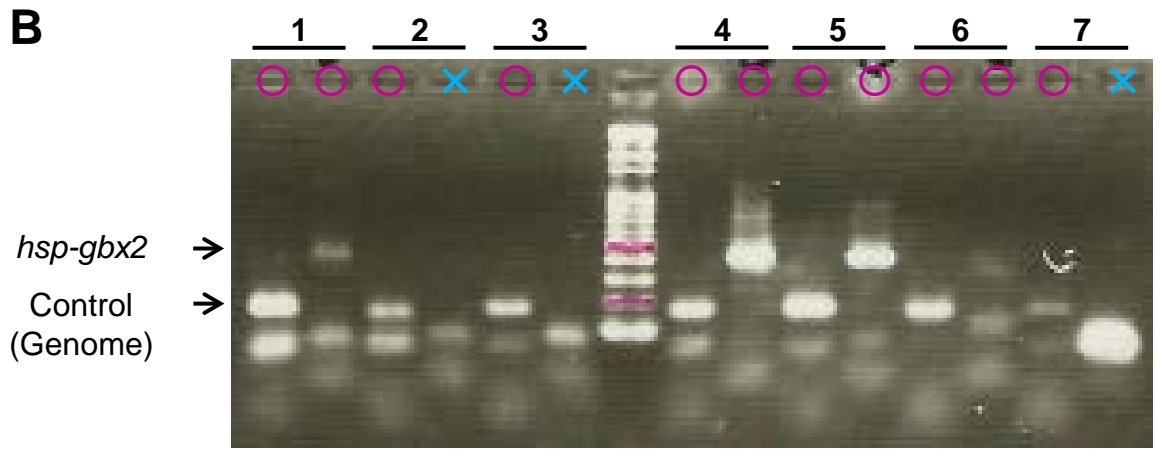


*six3b*



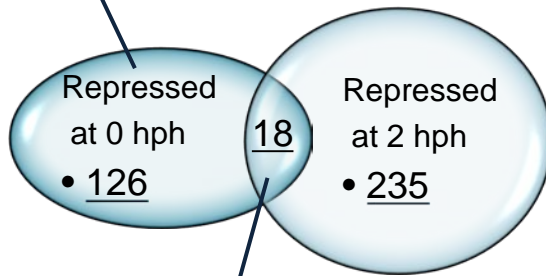
*pax2a*



**A****B****Figure 36**

## Repressed brain forming-genes at 0 hph

Gene name	Symbol	Signal Log <sub>2</sub> Ratio	ISH	Q-PCR
orthodenticle homolog 2	<i>otx2</i>	-0.5	Confirmed	Confirmed
retinol binding protein 4, like	<i>rbp4l</i>	-0.5		
homeo box B5b	<i>hoxb5b</i>	-0.3		Confirmed
NMDA receptor-regulated gene 1b-like /// N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit b	<i>naa15b</i>	-0.3		
neurogenin 1	<i>neurog1</i>	-0.3	N.D.	Confirmed
orthodenticle homolog 1b	<i>otx1b</i>	-0.3	Confirmed	Confirmed
zic family member 3 heterotaxy 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	<i>zic3</i>	-0.2	N.D.	

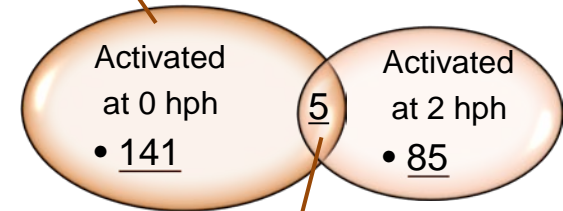


## Repressed genes at 0 hph and 2 hph

Gene name	Symbol	Signal Log <sub>2</sub> Ratio		ISH	Q-PCR
		0 hph	2 hph		
adducin 1 (alpha)	<i>add1</i>	-0.6	-0.7		
complement component 7	<i>c7</i>	-0.6	-0.7		
internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a	<i>inaa</i>	-0.5	-0.6		
Similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17	<i>LOC570565</i>	-0.5	-0.5		
SRY-box containing gene 32	<i>sox32</i>	-0.4	-1.9		
homeo box (expressed in ES cells) 1	<i>hex31</i>	-0.4	-0.7	Confirmed	
zgc:55813	<i>zgc:55813</i>	-0.4	-0.7		
structural maintenance of chromosomes 1A, like	<i>smc1al</i>	-0.4	-0.5		
---	---	-0.4	-1.2		
Kruppel-like factor 2a	<i>klf2a</i>	-0.3	-0.5	Confirmed	
hairy-related 5	<i>her5</i>	-0.3	-0.6	Confirmed	Confirmed
RAS-like, family 11, member B	<i>rasl11b</i>	-0.3	-0.6		
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog	<i>maf</i>	-0.3	-0.4		
forkhead box 11	<i>fox11</i>	-0.3	-0.5	N.D.	Confirmed
ankyrin repeat domain 52	<i>ankrd52</i>	-0.3	-0.9		
wu:fe11c03	<i>wu:fe11c03</i>	-0.3	-0.5		
zgc:73324	<i>zgc:73324</i>	-0.3	-0.2		
sestrin 3	<i>sesn3</i>	-0.2	-0.5		

## Activated brain forming-genes at 0 hph

Gene name	Symbol	Signal Log <sub>2</sub> Ratio	ISH	Q-PCR
dopamine receptor D2 like	<i>drd2l</i>	1.1		N.D.
homeo box A3a	<i>hoxa3a</i>	0.7	N.D.	Confirmed
POU class 3 homeobox 2	<i>pou3f2</i>	0.7		Confirmed
homeo box C6b	<i>hoxc6b</i>	0.5		Confirmed
LIM homeobox 8a	<i>lhx8a</i>	0.4	N.D.	Confirmed
transcription factor 12	<i>tf12</i>	0.4		
forkhead box O3b	<i>foxo3b</i>	0.0		

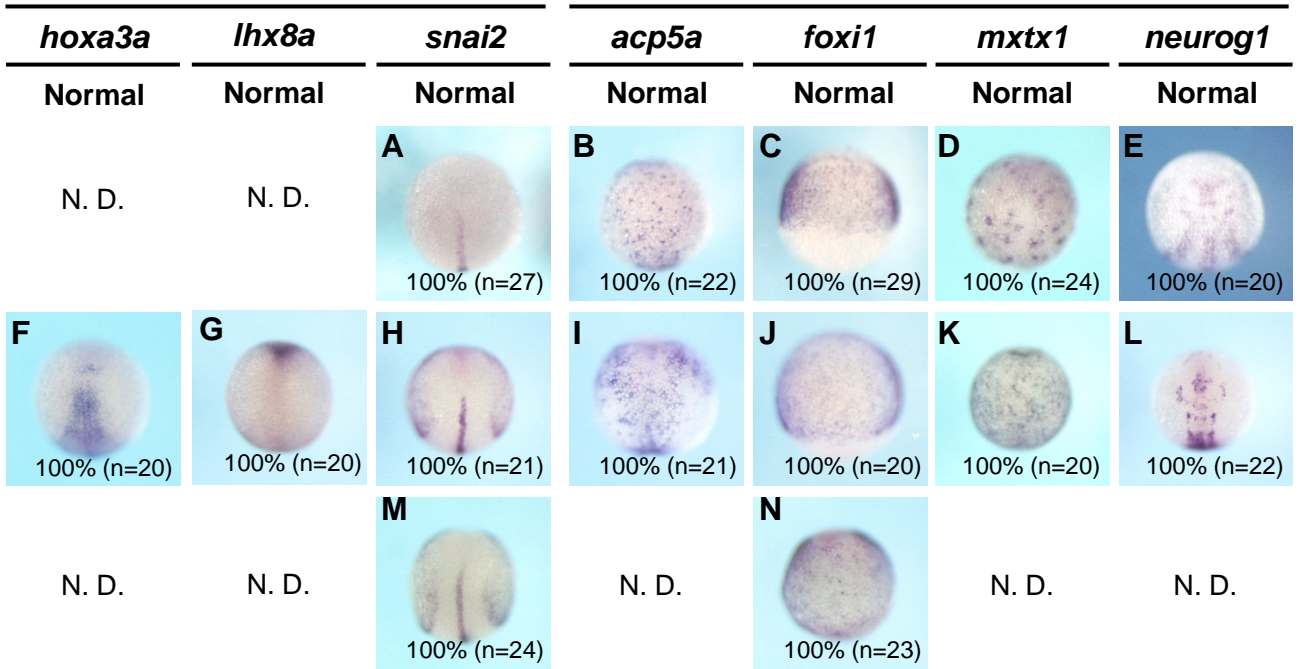


## Activated genes at 0 hph and 2 hph

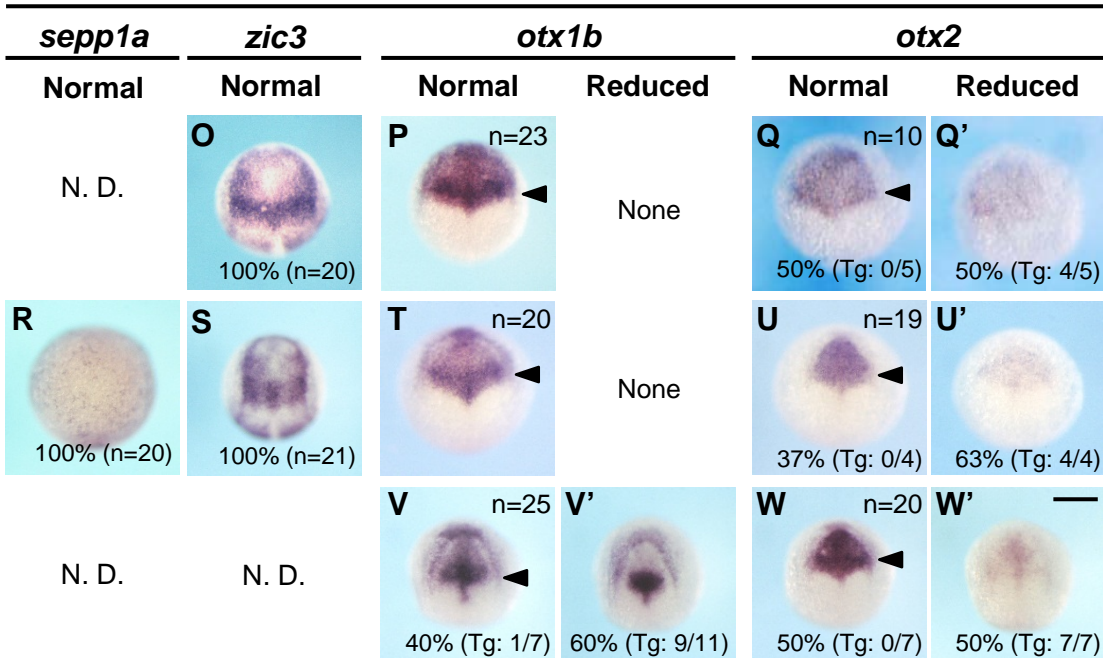
Gene name	Symbol	Signal Log <sub>2</sub> Ratio		ISH	Q-PCR
		0 hph	2 hph		
zgc:56585	<i>zgc:56585</i>	0.4	0.5		
hypothetical protein LOC402847	<i>LOC402847</i>	0.9	0.8		
---	---	0.8	0.5		
wu:fc84b06	<i>wu:fc84b06</i>	0.8	0.6		
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e, duplicate a	<i>atp5ia</i>	0.5	0.5	N.D.	
gene rich cluster, C10 gene	<i>grcc10</i>	0.7	0.4		

**Activated-MA**

**Repressed-MA**



**Repressed-MA**



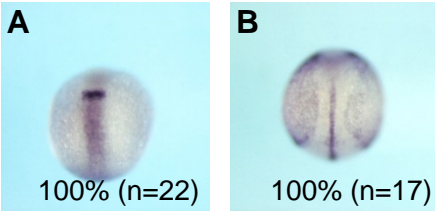
**Figure 38**



**Activated-MA**

*hoxa3a*

*snai2*



Normal

100% (n=22)

100% (n=17)

**Repressed-MA**

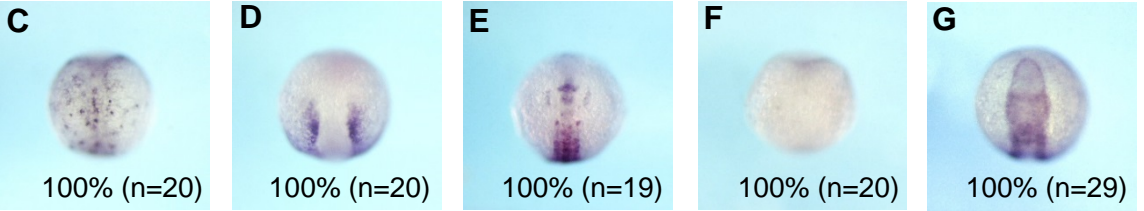
*acp5a*

*foxi1*

*neurog1*

*sepp1a*

*zic3*



Normal

100% (n=20)

100% (n=20)

100% (n=19)

100% (n=20)

100% (n=29)

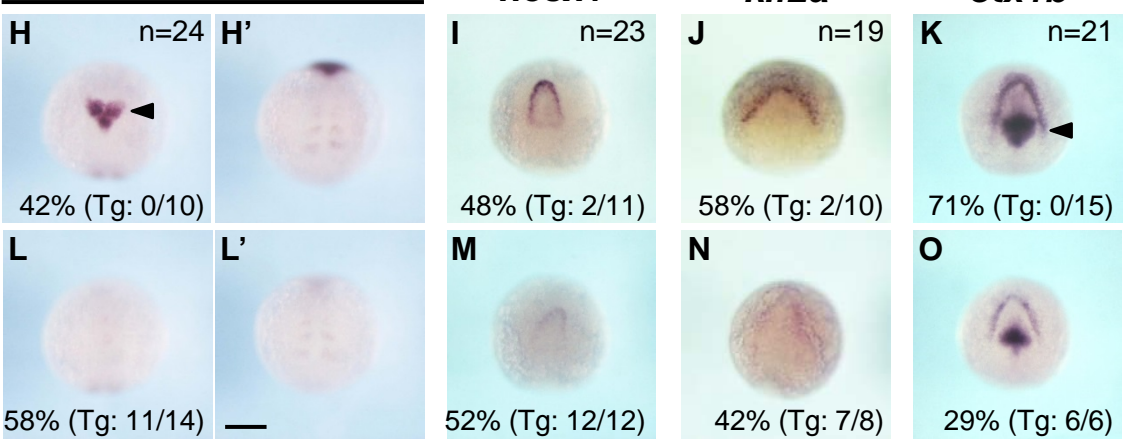
**Repressed-MA**

*her5*

*hesx1*

*klf2a*

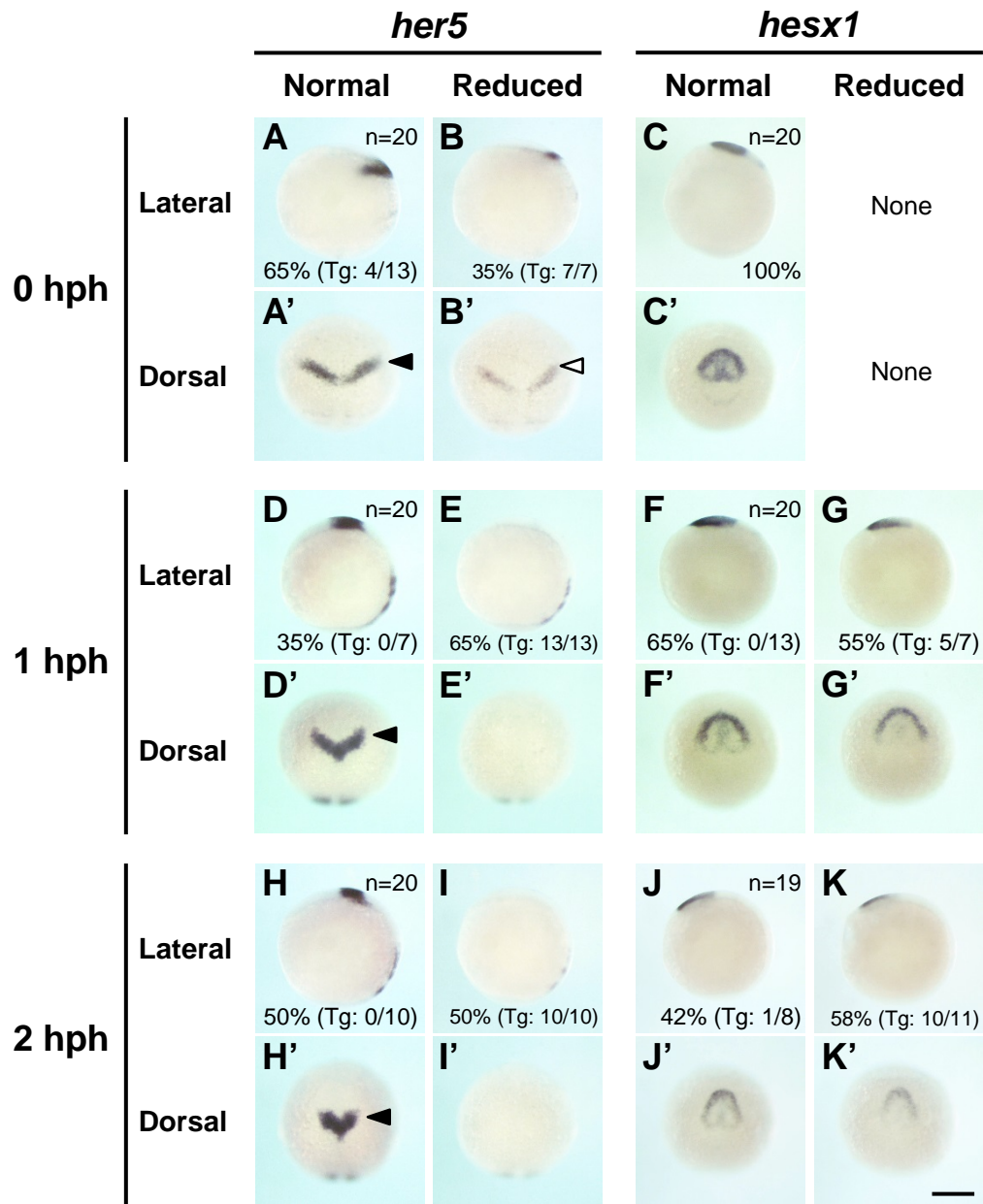
*otx1b*



Normal

Reduced

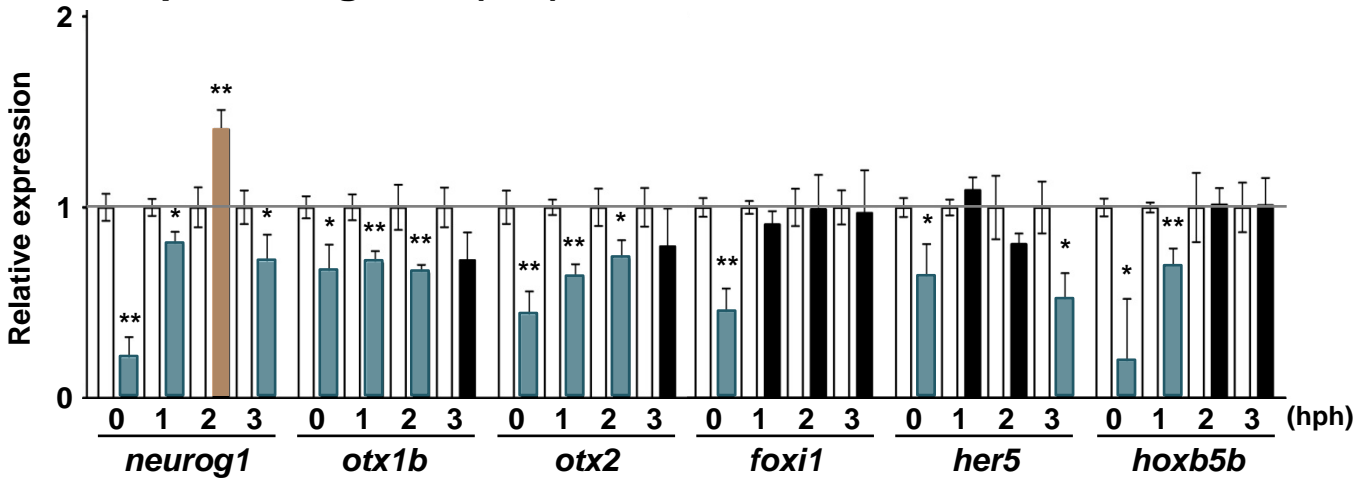
**Figure 39**



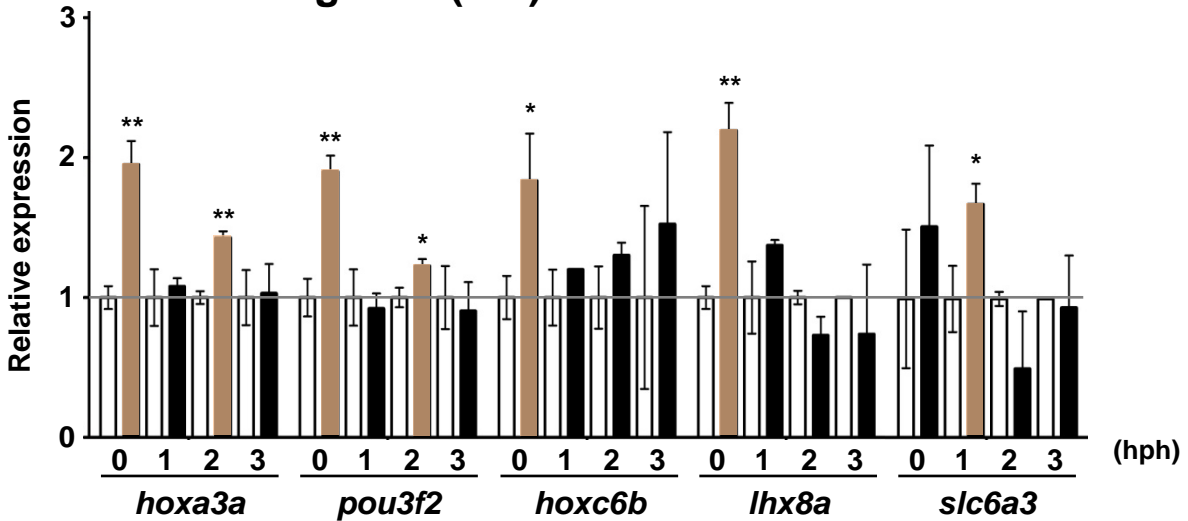
**Figure 40**



## Repressed genes (MA)



## Activated genes (MA)



□ wild-type sibling

■ *hsp-gbx2*<sup>+/-</sup>

■ upregulated (*p*<0.05)

■ downregulated (*p*<0.05)

Figure 41

	CD1	Eh1	IVR	Pro
<b>Gbx2</b>	<u>MSAAFSTPFMMMQRPVVGSTTAFSIDSLIGGPPQPSPGHFVYTGYPMFMPYRSVVLPPPPP</u>			
<b>Gbx1</b>	-----MQRPSGTGTAFSIDSLIG-TPQPRPGHLLYTGYPMFMPYRPLMIP--QA			
	**** *: ***** .*** **::***** .:::*			
	<b>CD2</b>			
<b>Gbx2</b>	<u>PPPPTLPQSALPTTHPHHPIPG-LPSSFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSSSPS---QQ</u>			
<b>Gbx1</b>	LSHSSLP-SGIPPLAPLASFAGRLTNTFCAGLGQGMPSMVALTTTLP-SFSDPPDSFYPP			
	. .:** *.:* . * .:* *..:**.*.***. :* :*** .**..*			
<b>Gbx2</b>	HQDAARKLGSQSIHAMFDKSQDIRLDGEDGKTFATKDSTSI PSFHDSQSVHTSTVRGHSK			
<b>Gbx1</b>	QEMPGPRLGADGTGMNRQESPHDELKGSSELLNFT---ETFQAVAGETKLYSSDDE-KLD			
	:: .. :***:: . : * . .*.*: .*: : : . . :::: * . : .			
<b>Gbx2</b>	DDSKEDDCHRKDESFMSDSDLDYSSDDNGPGNAMCQKEDGDGSGGLDDGVHGGNGAGNTT			
<b>Gbx1</b>	LKAEEAACSDREDS-SADSENEFSFDGN---TCASASQKGLKGGSDALPPGG-----			
	. : * * :::* * **: : **.* .. ..:* ..** :*.: *			
	<b>CD3</b>	<b>Homeodomain</b>		
<b>Gbx2</b>	<u>STGKNRRRRRTAFTSEQLLELEKEFHCKKYLSLTERSQIAHALKLSEVQVKIWFQNRRAKW</u>			
<b>Gbx1</b>	<u>SAGKSRRRRRTAFTSEQLLELEKEFHCKKYLSLTERSQIAHALKLSEVQVKIWFQNRRAKW</u>			
	*:* . *****			
	<b>CD4</b>			
<b>Gbx2</b>	<u>KRVKAGNVNSKTGEP SRNPKIVVPIPVHVS RFAIRSQHQQLEQ-ARP</u>			
<b>Gbx1</b>	<u>KRIKAGNVN NRSGE PVRNPKIVVPIPVHVNRFAVRSQHQQIEPGSRP</u>			
	**:* ***** .:*** ***** .***:*****:* :**			

Figure 42