

# Wnt, TGF $\beta$ ファミリー

## 両生類のオーガナイザー形成の分子機構

橋本主税

両生類の体軸形成にはオーガナイザー形成が決定的に重要である。近年、オーガナイザー形成はWntファミリーとTGF  $\beta$  ファミリーの2種類のシグナル経路により時間的・空間的に厳密な制御を受けていることがわかってきた。胚発生学によって理解されてきた発生現象の分子レベルでの解明が急速に進み、新たな側面が次々と明らかになってきた。

### key words

オーガナイザー, ニュークープセンター, TGF  $\beta$ , Wnt, dorso-ventral axis (背腹軸)

### はじめに

脊椎動物の体軸形成は初期発生過程における最も重要な現象のひとつである。体軸形成の制御機構は種を超えて高度に保存されていることが分子レベルで次々と明らかにされ、それぞれの生物種の利点を生かして得られた知見を統合して相互理解することで、この分野は急速に進展している。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*, 以下ツメガエル) を含む両生類を用いた研究は、歴史的な知識の蓄積や発生学研究材料としての利点によって、この研究領域の最先端の一角を担っている。

成体に存在する3本の体軸(頭尾, 背腹, 左右)を形成する段階で、ツメガエルでは背腹軸の決定が重要であるということがわかっている。さらに、“背腹軸を決定すること”は“予定背側領域にオーガナイザー (organizer) とよばれる機能領域を形成すること”と同義である。したがって、“いかにしてオーガナイザーが形成されるか”という分子機構の理解は、

すなわち“胚に体軸が決定される機構”の理解といえる。本稿では、ツメガエル胚においてオーガナイザーが形成される機構を、シグナル伝達の視点から分子レベルで概観する。

### I. オーガナイザーとは

両生類のオーガナイザーは、別の胚の予定腹側領域に移植することで腹側に背側体軸構造を誘導して、結果としていわゆるシャム双生児を生じる活性をもつ領域として、初期原腸胚の原口背唇部に見いだされた<sup>1)</sup>。二次体軸中では移植片はおもに脊索など中軸組織を形成しているだけで、他の大部分の組織は宿主由来の細胞からなっており、正しくパターン形成された(すなわち“オーガナイズ”された)背側体軸が新たに形成されていた(図1)。

オーガナイザーは、組織学的にいえば背側として高度に特殊化された中胚葉に相当する。ツメガエルの中胚葉は、植物半球の内胚葉組織から出される中胚葉誘導因子によって、動物半球と植物半球がぶつ

### Signal Transduction Involved in the Organizer Formation in Amphibian Embryos

HASHIMOTO Chikara 京都大学ウイルス研究所 遺伝子動態調節部門・情報高分子化学分野

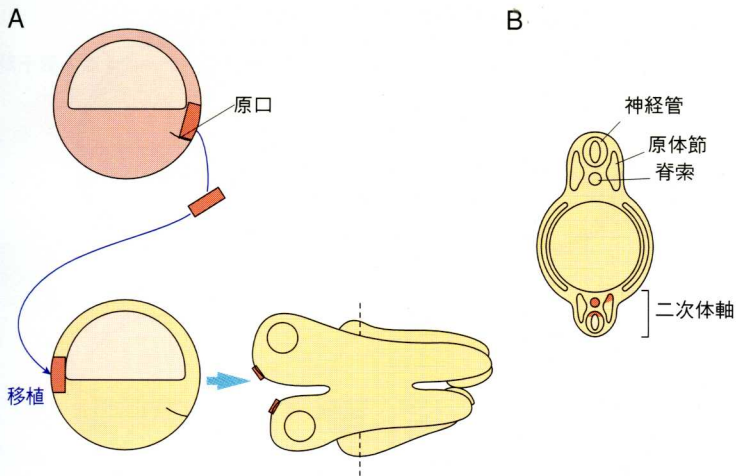


図1 ● オーガナイザーの実験

A: 初期原腸胚の原口背唇部(赤い部分)を別の胚の予定腹側領域に移植すると、本来腹側となる領域に“オーガナイザー”された背側体軸が誘導される。

B: Aの点線で切断した断面図。二次体軸の中で移植片由来の組織(赤く表されている)は脊索など一部の中軸組織に限られており、体軸構造の大半の部分は宿主由来であることがわかる。

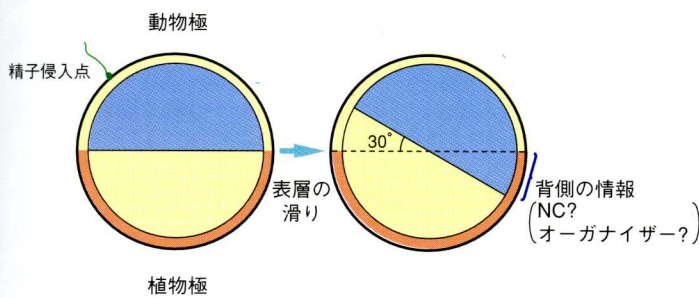


図2 ● 受精後に起こる卵表層の滑り

受精卵の表層は受精のとき卵に精子が侵入する点の方向に、内部細胞質に対して約30度滑る。この滑りは内部細胞質の動物半球と植物半球の表層を接触させる。この新たに接触した領域は将来オーガナイザーとなる領域におおまかに一致することから、この接触が背側情報を生み出すという考えもある。NC; ニュークープセンター。

かる“帯域”とよばれる領域に誘導されると考えられているが、オーガナイザーを誘導する内胚葉組織は背側として特殊化されており、特にニュークープセンター(Nieuwkoop center; NC)<sup>2)</sup>とよばれている。したがって、オーガナイザー形成過程を胚発生的にみると、まずNCが形成され、それからオーガナイザーが誘導されるということになる(図3A参照)。

## II. オーガナイザー形成過程

ツメガエルでは背側を決定する情報は受精の瞬間に与えられ、様々な誘導現象を介してオーガナイザー形成へと受け継がれて、やがて背側としての構造が生じることが知られている。

### ● 1. 胚発生的解析による知見

受精卵の表層は受精のとき卵に精子が侵入する点の方向に、内部細胞質に対して約30度滑る<sup>3)</sup>(cortical rotation, 図2)。人為的にこの滑りを阻害すると、背側構造をまったくもたない胚が生じる一方、本来と

逆方向に人為的に滑りを与えると、精子侵入点側を背側にすることができるという事実から、この滑りという物理的な動きが、精子の侵入による背腹軸情報の正体であることがわかる。この滑りによる背腹軸決定機構の詳細はまだ理解されていないが、滑りによって植物極周辺の表層が赤道付近の内部細胞質と物理的に接触することで、この接触領域が背側の情報をもつようになるものと考えられている。

滑りによって生じた位置情報は、背側植物極側領域に形成されるNCに伝えられる。この領域はオーガナイザー領域よりも植物極側に認められること、およびこの活性がオーガナイザー形成より早い段階で認められることから、オーガナイザーを直接誘導する領域と考えられた。ツメガエル胚では、胞胚中期のMBT(mid blastula transition)とよばれる時期になるまで染色体からの転写が行われないので、MBT以前に完了するNC形成までの過程を担う因子は卵由来と考えられている。NCによるオーガナイザーの誘導



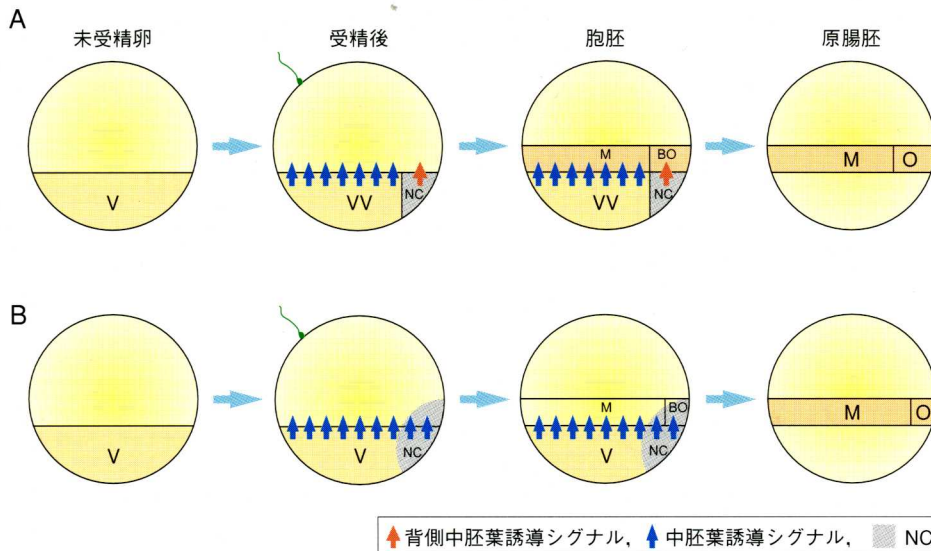


図3 ● 中胚葉とオーガナイザーの誘導

A: 胚発生的解析から提示されたモデル. 受精による背腹軸の情報によって, 初期胚の植物極側の領域 (V) は, ニュークープセンター (NC) とその他の部域 (VV) に分けられる. NCは背側として特殊化された中胚葉 (胞胚オーガナイザー, BO) を誘導し, VVはその他の中胚葉 (M) を誘導する. その後, BOがオーガナイザー (O) となって, その後の体軸形成やパターン形成を行う.

B: 分子生物学的解析から提示されたモデル. 植物極側組織からは均一に中胚葉誘導物質が出されて, 帯域を中胚葉に誘導する. 同時に背側領域には, 表層の回転によってつくられた背側の情報が存在する. これら2つのシグナルが交わる帯域はBOとして誘導され, その後オーガナイザー (O) へと変わる.

はMBT後に起こるが, 本来のオーガナイザーが形成されるには時期的に早いため, この誘導された領域を本来のオーガナイザーと分けて胞胚オーガナイザー (blastula organizer; BO) とよぶこともある (この場合, 本来のオーガナイザーを原腸胚オーガナイザー, gastrula organizerとよんで区別することもがあるが, 本稿では単にオーガナイザーとよぶ). BOは原腸陥入が始まる時期までに, オーガナイザーとなり, その後の体軸形成に関与する (図3A).

● 2. 分子生物学的解析による知見

胚発生的にはこのように理解されているオーガナイザー形成機構を分子的な知見を加えて検証してみよう.

オーガナイザー領域に特異的に発現する *gsc* (*goosecoid*) とよばれる遺伝子は, 腹側で発現させると二次体軸を誘導できることから, オーガナイザー活性の一翼を担う分子として考えられており<sup>4)</sup>, その発現の制御機構を知ることでオーガナイザーの形成機構を探ることができると考えられている. *gsc*の発

現は Wnt ファミリーの1種である *Xwnt8* と TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) ファミリーに属するアクチビン (activin) によって誘導することができる. これらの因子自体が, 実際に胚発生の段階で機能しているかについては今のところ定かではないが, そのシグナル経路の活性化がオーガナイザー形成に何らかの役割を担っていることが推測できる.

*Xwnt8* はNC活性を模倣して帯域にオーガナイザーを誘導できるが, 胚発生的にいうNCの定義の1つである中胚葉誘導活性をもたなかった. また, アクチビンは多分化能を有する外胚葉領域を中胚葉組織に誘導するが, この誘導は濃度依存的であり, 濃度が高くなるほどより背側の中胚葉を誘導できることから, 中胚葉のパターン形成に関与する可能性が示唆されている<sup>5)</sup>. この性質からアクチビン活性は背側から腹側にかけて濃度勾配を形成していると考えられていた.

*gsc*のプロモーター領域にはアクチビンシグナルに反応する領域 (activin response element; ARE) と

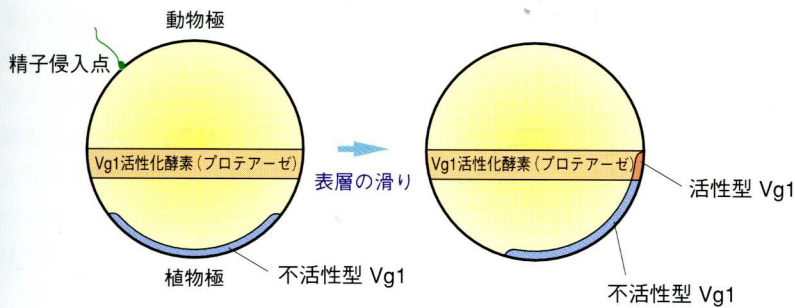


図4 ● Vg1 活性化による背側情報の制御

不活性型Vg1は植物極側表層に局在しており、存在が予想されるVg1の成熟に関するVg1活性化酵素(プロテアーゼ)は内部細胞質の帯域に存在している。表層の滑りによって不活性型Vg1が背側方向に移動し、プロテアーゼと出会うと活性型になり、その領域にオーガナイザーを誘導する。

Xwnt8シグナルに反応する領域(Wnt response element; WRE)がそれぞれ存在する。このAREあるいはWREをもつプロモーターの支配下にレポーター遺伝子を組み込んで胚におけるそれぞれの因子の分布を調べたところ、アクチビンシグナルは予想に反して植物半球全域に均一に存在していたが、Wntシグナルは背側の帯域から植物半球にかけて局在していることがわかった<sup>6)</sup>。

これらの事実からオーガナイザー形成機構は次のように考えることができる。すなわち、オーガナイザーの誘導は中胚葉誘導と背側組織への誘導の2つの誘導現象の混合であり、植物極側領域から出された中胚葉誘導因子によって帯域部分が均一中胚葉となり、均質に誘導された中胚葉組織を背側植物極側から出される背側化因子は背側中胚葉組織、すなわちオーガナイザーとして特殊化するというものである。これによれば、NC特異的な活性としては中胚葉誘導活性を必ずしも必要としないということになる(図3B)。現在ではこの中胚葉を背側化させる活性がNC活性の狭義の意味として使われている。

### Ⅲ. オーガナイザー形成に関するシグナル伝達

オーガナイザー形成過程の制御機構を簡単にみてきたが、ここでは表層の回転・NC・BOなどを経てオーガナイザー形成へとつながるシグナルの流れを、それぞれの現象ごとに解説する。

●1. Vg1によるオーガナイザー形成:表層の滑りの情報がいかにかしてオーガナイザーにつながるか  
表層の滑りを背腹軸の情報として考える場合に、Vg1の成熟機構をもとにした非常に魅力的なモデルが提出されている<sup>7), 8)</sup>。Vg1は、そのmRNAが植物極

表層に局在する分子として得られ、TGF $\beta$ ファミリーに属する分泌性因子である。TGF $\beta$ ファミリーの因子は、前駆体タンパク質がジスルフィド結合(S-S結合)によってホモあるいはヘテロ二量体を形成し、その後の特異的なプロテアーゼによって切断を受け、活性型となることが知られている。ところが、Vg1には切断部位のコンセンサス配列が存在せず、さらにはそのmRNAを腹側に注入しても二次軸を誘導することができない。しかし、このタンパク質の本来切断されるであろう部位にBMP2(bone morphogenic protein 2)の切断部位の配列を組み込んだもの(Bvg1)には強い体軸誘導活性がみられた<sup>9)</sup>。

これらの事実から次のようなモデルが提出された。v $g1$  mRNAは植物極側表層に存在するが、表層の回転によってこれらの一部は背側領域で内部細胞質の帯域と接する。内部細胞質の帯域ではVg1特異的なプロテアーゼが局在するので、これらが接した部分ではVg1の切断が特異的に行われ、活性型Vg1が生成される。これによって背側化シグナルとなり、MBT以降にオーガナイザーを誘導できるというものである(図4)。ただし、Vg1はアクチビンと同様にgscの誘導を直接行うと考えられていることや、その生物活性から考えてBvg1は完全なオーガナイザーを誘導できると考えられることなどから、表層の滑りによる情報は、この場合、Wntシグナル経路を経由することなくオーガナイザー形成にVg1を介して直接伝わるということになる。

●2. ニュークープセンターとXwnt8シグナル:  
Xwnt8シグナルの正体

Xwnt8のシグナル伝達経路をそのmRNAの注入によりMBT以前に腹側で活性化させると、二次軸を誘



導することができる<sup>10)</sup>、逆にMBT以降に*Xwnt8*を腹側で発現させた場合には二次胚の誘導は起こらない。これらの事実から、NC活性としてのWntリガンドは、母性因子として卵の中に存在しているということが考えられた。しかし、Wntリガンドのドミナントネガティブ変異体が背腹軸形成に影響を及ぼさないこと<sup>11)</sup>から考えて、母性Wntシグナルの存在は疑問視されている。では、Wntシグナルによる軸形成はいったい何であるのだろうか。

ここで、ツメガエルにおいてWntシグナル経路(図5参照)に関与すると考えられている因子の背腹軸形成に及ぼす影響についてみてみよう。ショウジョウバエの*dsh* (*dishevelled*)の相同遺伝子である*Xdsh*の母性mRNAをアンチセンスオリゴヌクレオチドで阻害しても背腹軸形成には影響しない。しかし、 $\beta$ -カテニン ( $\beta$ -catenin)の母性mRNAを阻害すると背腹軸誘導活性がなくなる<sup>12)</sup>。この失われた背腹軸は $\beta$ -カテニンをMBT以前に発現させることによって回復するが、MBT以降にこれを発現させても背腹軸は回復しないことから、 $\beta$ -カテニンの効果は母性であると考えられる。さらに、 $\beta$ -カテニンの安定性をリン酸化によって調節するグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素3 (*Xenopus glycogen synthase kinase 3*; *Xgsk3*)のドミナントネガティブ変異体は背腹軸誘導活性をもつ<sup>13)</sup>。

これらの事実から、Wntシグナル伝達経路(図5)の中で、*Xgsk3*の制御より下流の経路が背腹軸形成において重要であると考えられる。すなわち、Wntリガンドや*Xdsh*は背腹軸形成には関与せず、表層の滑りによる情報は母性*Xgsk3*に直接伝わり、*Xgsk3*による $\beta$ -カテニンのリン酸化が抑制される<sup>14)</sup>。これによって、細胞内で安定となった $\beta$ -カテニンは、*Lef1* (lymphoid enhancer-binding factor 1)の相同遺伝子である転写因子*Xtcf-3*と複合体を形成して核内に移行し、この複合体がオーガナイザー特異的遺伝子の発現を誘導する<sup>15)</sup>ということである。

ここで、*Xgsk3*活性の阻害が背腹軸形成に重要であると考えられるが、その分子機構はまだ明らかではない。しかし、特異的結合タンパク質による*Xgsk3*活性の阻害機構の存在がいわれているので、Vg1の活性化モデルで想定されたプロテアーゼのように、

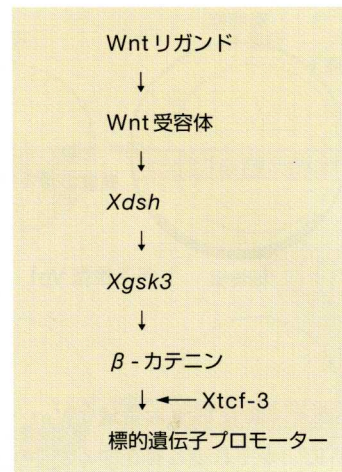


図5 ● Wntシグナル経路

Wntリガンドが細胞に到達すると、まず細胞内では*dishevelled*のツメガエルにおける相同遺伝子である*Xdsh*が*shaggy / zw3*の相同遺伝子である*Xgsk3*のセリンキナーゼによる $\beta$ -カテニンのリン酸化を抑制する。リン酸化を受けていない $\beta$ -カテニンは細胞内で安定となって、転写因子LEF1のツメガエルのホモログである*Xtcf-3*と複合体を形成する。複合体は核内に移行し標的遺伝子の発現を誘導して、オーガナイザー形成を行う。

この*Xgsk3*結合タンパク質の活性が何らかの機構で背側特異的に局在すると考えるとおもしろい。

### ● 3. 胞胚オーガナイザーからオーガナイザーへ

筆者らは、ホメオボックスタンパク質をコードする新しい遺伝子*Xtwin*をツメガエルで単離した(投稿中)。*Xtwin*の発現は背側帯域に局在しており、MBTから原腸胚期に入るまで持続する。*Xtwin*はWntシグナルによって発現が誘導され、また*Xtwin*を発現させることによってオーガナイザー特異的遺伝子発現が誘導される。これらの性質から、*Xtwin*はBO特異的遺伝子の1つであるといえる。また、この遺伝子産物による*gsc*の発現誘導が、*gsc*プロモーター上のWREを介しているという事実は、NCシグナルとしてのWntシグナルをBO因子としての*Xtwin*が受け、オーガナイザーへと渡すというモデルを支持する。

*Xtwin*の発現は正常発生している胚ではBOに相当する領域に局在しているが、人為的に表層の回転を止めた胚においては植物極に局在していることから、*Xtwin*の発現領域が表層の回転に密接に依存していることがわかる。さらにこの事実は、表層の滑りを止めた胚においては*Xgsk3*- $\beta$ -カテニンシグナルも植物

極に局在している可能性を示唆する。これは、表層の滑りの役割がNCを活性化する細胞質因子(胚発生学ではこれを細胞質ドミネラントとよぶ)を胚の帯域あたりにまで単に運ぶというのみであって、胚発生学で示唆された滑りの役割、すなわち表層の特定の領域と内部細胞質の特定の領域が接触することではないという可能性を示す事実としても興味深い。

Siamoisはアミノ酸配列においてXtwinと高い相同性を示す(全体で約50%、ホメオボックス内では88%)。また、SiamoisはWntシグナルによって発現が誘導され、さらにオーガナイザー特異的遺伝子の発現を誘導する。これらの事実はSiamoisとXtwinが基本的に同様の活性をもつことを示唆する。しかし、SiamoisはXtwinと違い植物極側領域に発現すると報告されており<sup>16), 17)</sup>、この点での相違が何に由来するものであるかが注目される。

#### IV. オーガナイザー形成過程における負の制御

オーガナイザー形成において負の制御が存在するという考えを簡単に紹介しておこう。

##### ● 1. オーガナイザーの維持機構

###### 1) オーガナイザーの再生

ツメガエルにおいて、オーガナイザー領域を切除しても、その周りの領域にオーガナイザー活性が再生される<sup>18)</sup>。同様の現象は他の生物種においてもみられる<sup>19)</sup>ことから、背腹軸決定に重要な役割をもつオーガナイザーは一般に再生可能な機能領域であると考えられる。オーガナイザーを取り除いたツメガエル胚の発生は正常発生と比較して数時間遅れ、この遅れはMBTからオーガナイザーが形成されるまでの時間と考えても矛盾はしない。したがって、オーガナイザーの再生は正常発生過程におけるその形成と同じ機構による可能性が指摘できる。実際、NCが存在し続けてさえいれば、同じ場所にオーガナイザーが再生されても不思議ではない。しかし、正常発生過程でオーガナイザーが正しく存在しているときには胚のいかなる領域にもオーガナイザーが形成されることはない。これらの事実は、胚には、オーガナイザーが存在しているときには再生機構をオフにし、オーガナイザーが存在しないときに再生機構をオンにする制御機構が存在することを示している。

##### 2) ADMP

ADMP (anti-dorsalizing morphogenetic protein) とよばれるTGF $\beta$ ファミリーに属する因子はオーガナイザー形成を抑制する活性をもつが、不思議なことに、この遺伝子はオーガナイザー領域特異的に発現しており、*gsc*同様、アクチビンとWntシグナルによって誘導される<sup>20)</sup>。この遺伝子の胚の中での機能は、胚の他の領域に新たなオーガナイザーが形成されないように周りの組織を抑制することに関与していると考えられる。このとき、例えばこの因子の受容体がオーガナイザーには存在しない、あるいはこの因子が発現する段階では、すでにオーガナイザーの形成は完了しており、この因子の影響をオーガナイザー自身が受けることがないなどの、実際に形成されているオーガナイザーを抑制しない何らかの機構の存在が要求される。ADMPに関してはまだまだ今後の研究が待たれるが、アイデアとしては魅力的である。

##### ● 2. 形成されたオーガナイザーによる体軸形成機構

背腹軸形成の負の制御機構はオーガナイザーが形成された後の体軸形成過程においてもみられる。今までみてきたように、オーガナイザー形成までは背側が積極的に決められている。しかし、いったん形成されたオーガナイザーが背側構造をオーガナイズする機構は、TGF $\beta$ ファミリーの1種BMPなどの腹側化因子の活性<sup>21), 22)</sup>を分泌性のオーガナイザー因子であるChordin<sup>23)</sup>やNoggin<sup>24)</sup>によって阻害することによって行われていることがわかっている。要するに、BMPやChordin, Nogginといった因子は、形態形成運動開始に伴って起こる胚のパターン形成時に機能するものであり、背腹軸が決定された後で、オーガナイザーが引き金となってこれらの因子の相互作用がはじまり、胚のパターンが決定されていくのである。

#### V. ニュークープセンターの再考

最後に、胚発生学により定義されたNCという言葉について分子発生学の知見を踏まえて再度考えてみる。空間的に考えた場合、現在知られているシグナルの流れから判断すれば、NCは背側植物半球だけをさすのではなく、オーガナイザーの領域ともおそらく



オーバーラップしている。また時間的に考えた場合、ツメガエルのオーガナイザーが形成されるまでの分子機構は、今までみてきたように非常に連続的であり、オーガナイザー形成は背側の情報が滞りなく流れた結果といえる。その流れの中で、唯一時間的に明確に定義できるのはMBTであるので、シグナルの流れをMBTの前と後に区分して考えてみよう。

MBTに至るまでの時間は、例えばWntシグナル経路の活性化などによるオーガナイザー形成の準備時期であり、MBT後にこの準備されたシグナルによりオーガナイザー形成への一連のシグナル伝達がはじまるといえる。この考えに従えば、NCはMBT以前に形成される一連のシグナルのことをさし、オーガナイザーはMBT以降から原腸陥入開始に至る一連の分子機構そのもの、あるいはそれらが具現化したものをさすと定義できる。オーガナイザー形成過程をこのように分けて考えると一連の現象を整理しやすいと感じられるので、本稿ではこれを採用した。しかし、オーガナイザーを直接誘導するという考えから

BOをNCであるとする考えも一部にはある。実際問題として、オーガナイザー形成の分子機構がこのような言葉の定義によって変化するわけではないが、新たに分子発生学の知見を加えて胚発生学の単語を定義し直す時期にきているといえる。

## ■ おわりに

オーガナイザーは非常に複雑な機能を有し、それら機能の発現調節機構もおそらく非常に複雑な経路をたどると考えられるので、複数の制御機構が独立して存在し、それらが総合された結果としてオーガナイザーという機能領域が誘導されるのかもしれない。分子発生的知見は表層の滑りの役割に2つの可能性(WntとVg1)を与えたが、これは複雑なオーガナイザー形成の一端をかいま見ているのかもしれない。いずれにしても、現在知られている分子だけでは、オーガナイザー形成機構を完全に説明することができないので、今後新たな制御機構が発見されることが期待される。

## ■ 文献 ■

- 1) Spemann, H. & Mangold, H. : Wilhelm Roux's Arch. 100, 599-638 (1924)
- 2) Nieuwkoop, P. D. : Adv. Morphog. 10, 1-39 (1975)
- 3) Vincent, J. P., Oster, G. F. & Gerhart, J. C. : Dev. Biol. 113, 484-500 (1986)
- 4) Cho, K. W. Y., Blumberg, B., Steinbeisser, H. et al. : Cell 67, 1111-1120 (1991)
- 5) Green, J. B. & Smith, J. C. : Nature 347, 391-394 (1990)
- 6) Watabe, T., Kim, S., Candia, A. et al. : Genes Dev. 3038-3050 (1995)
- 7) Weeks, D. L. & Melton, D. A. : Cell 51, 861-867 (1987)
- 8) Melton, D. A. : Nature 328, 80-82 (1987)
- 9) Thomsen, G. H. & Melton, D. A. : Cell 74, 433-441 (1993)
- 10) Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. et al. : Cell 67, 741-752 (1991)
- 11) Hoppler, S., Brown, J. D. & Moon, R. T. : Genes Dev. 10, 2805-2817 (1996)
- 12) Heasman, J., Ginsberg, D., Geiger, B. et al. : Development 120, 49-57 (1994)
- 13) He, X., Saint-Jeannet, J. P., Woodgett, J. R. et al. : Nature 374, 617-622 (1995)
- 14) Yost, C., Torres, M., Miller, R. R. et al. : Genes Dev. 10, 1443-1454 (1996)
- 15) Molenaar, M., Vandewetering, M., Oosterwegel, M. et al. : Cell 86, 391-399 (1996)
- 16) Lemaire, P., Garret, N. & Gurdon, J. B. : Cell 81, 85-94 (1995)
- 17) Carnac, G., Kodjabachian, L., Gurdon, J. B. et al. : Development 122, 3055-3065 (1996)
- 18) Cooke, J. : J. Embryol. Exp. Morph. 30, 283-300 (1973)
- 19) Psychoyos, D. & Stern, C. D. : Development 122, 3263-3273 (1996)
- 20) Moos, M. Jr, Wang, S. & Krinks, M. : Development 121, 4293-4301 (1995)
- 21) Dale, L., Howes, G., Price, B. et al. : Development 115, 573-585 (1992)
- 22) Suzuki, A., Thies, R. S., Song, J. J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10255-10259 (1994)
- 23) Sasai, Y., Steinbeisser, H. & De Robertis, E. M. : Nature 376, 332-336 (1995)
- 24) Smith, W. C. & Harland, R. M. : Cell 70, 829-840 (1992)