

平成 13 年度科学研究費補助金「特別推進研究」

「脊椎動物頭部形態形成の遺伝発生学的解析」

(平成 8 ~ 12 年度)

平成 13 年 10 月

熊本大学・発生医学研究センター・教授・相沢慎一

1. 研究課題名：脊椎動物頭部形態形成の遺伝発生学的解析
2. 研究期間：平成8年度から平成12年度
3. 課題代表者：相沢慎一（熊本大学発生医学研究センター・教授）

4. 研究の目的・意義及び計画の概要

全ての脊椎動物の体は体節の分節性に規定された体幹部、2つのロンボメーが1つの咽頭弓と対応するという分節性を持つ脳・咽頭弓部、さらにその前にある分節的形成様式の明らかでない吻側頭部という3つの部分よりなる。本研究は、この様な体造りが個体発生においてどの様な分子基盤のもと成立しているかを明らかにし、系統発生上の変遷、脊椎動物の起源について考察を得ることを究極目的とした。全ての動物は頭から生まれ、頭の形成機構を明らかにすることは脊椎動物の体造りを明らかにすることに他ならない。その過程は前後軸・背腹軸の形成という動物体造りの基本機構と密接不可分である。他方、進化の過程で発生様式を基本機構から様々にデフォルムすることによって様々な脊椎動物が生まれた。この過程で、顎の形成、新皮質の形成など新たな所産が生まれた。以上の視点の下本研究では、Otx, Emx ファミリー遺伝子の機能を遺伝発生学的に解析することによって、頭部形成の分子基盤を明らかにすることを計画した。

5. 研究成果の概要

哺乳動物の前後軸及び頭部形成の基本スキームを明らかにし、ロンボメー1, 2 (r1/2) 領域が哺乳動物ボディプランにおける基底状態であることを提唱した。すなわち、ヘッドオーガナイザー (HO) 形成に関わる Otx2 とトランクオーガナイザー (TO) 形成に関わる Cripto は最初エピプラストで協働して働き、遠位部原始内胚葉 (DVE) にヘッドオーガナイザーを形成する。ついで DVE はエピプラストに働き TO を近位部に局在させ、前後軸はまず遠近軸に沿って生じる。その後 DVE が将来の吻側に移動し AVE を形成、これと対応して近位部エピプラスト細胞が将来の尾側に移動することによって最終的な前後軸が形成され、尾側エピプラストに原条が形成される。HO, TO がともに欠損すると r1/2 のみが生じる。AVE は外胚葉に後方化シグナルを抑制することによって、ついでノードからの吻側内中胚葉が前方化シグナルを送ることによって、2段階で吻側領域が神経外胚葉に誘起される。各段階で Otx2 は必須の働きをする。ついで、誘導された吻側神経管で原脳領域が形成され、中脳・間脳が領域形成される分子基盤を明らかにし、r1/2 より吻側領域は1つの単位として発生、より吻側構造の欠損は r1/2 の拡大によって補われることを明らかにした。また、原皮質形成の基本機構を明らかにしつつある。さらに、層構造を持つ新皮質形成に際しバイオニアーニューロンとして働くカハールレチウス細胞とサブプレートニューロンの形成機構を明らかにした。

・研究の背景

ヤツメウナギからヒトまで、それぞれの脊椎動物はそれぞれに特有のやりかたで発生し、特有の形をとる。しかし von Baer は、脊椎動物は脊椎動物であるため咽頭胚期でだけはその形を変えることが出来なかつたと考えた。すべての脊椎動物に共通な体造りの基本プランはこの咽頭胚に明瞭に看てとることができる。その体幹部は、末梢神経の規則的配列に見られるように、傍軸中胚葉より形成される体節の分節的存在様式に既定されている。しかし体節は耳胞より前には存在せず、咽頭胚期のこの領域には我々哺乳動物の先祖が海にいたことを物語る一連の鰓弓（咽頭弓）構造が存在する（陸生脊椎動物では鰓弓は鰓としての機能を失い様々な頭部構造の形成に転用された）。また、この領域の神経管（菱脳）には自立的くびれの構造が現れ（ロンボメラー）、神経堤細胞の配向に見られるよう、2つのロンボメラーは1つの鰓弓と対をなす。主として前脳、中脳よりなる吻側頭部はさらにその前の構造物として存在し、Rubenstein らは Prosomeric Model を提出し、この領域にも分節的形成様式のあることを提唱しているが、その分節性は依然として議論のあるところである。吻側頭部においてはまた、頭蓋骨、脳神経の形成に頭部神経堤細胞が主要な役割を果たすが、頭蓋骨、脳神経の位置づけと起源も解剖学的一大課題である。

以上のように体が、体幹部、菱脳・鰓弓部、吻側頭部という異なる分節性をもつ3つの領域から成りたつことは、神経堤細胞の存在とともに脊椎動物の共通派生形質である。ではこの様な体の造りは、個体発生学的にどの様な機構で成立し、また系統発生学的にどの様に成立したのであろうか。現存する原索動物ナメクジウオは脊椎動物に最も近縁で、共通祖先から由来した姉妹動物と考えられている。このナメクジウオが脊椎動物に相当する体幹部をもつが、脊椎動物に相当する脳をもたないことなどより、頭を胴体の先に後から出来る構造と考える俗説が生物学者の間ですら根強い。しかしカンブリアの海で生まれた、すべての動いて餌を求める動物は頭より形成され、体幹部は頭の後ろに後から出来る構造である。環形動物ゴカイのトロコフォア幼生は成体の頭で、胴体は後から発生する。動物は本来ゴカイのように幼生形を経て成体を形成する（間接発生）が、evolution の過程で、特に陸上生活に適応した動物たちは、幼生形を省略し直接成体を形成する発生方法を編み出した（直接発生）。ショウジョウバエの発生はその中でも極めて特殊化したものであり、頭部から尾部までが同時に形成される。しかし、バッタの発生にみられるよう、まず頭部が形成され、胸部、胴尾部は最初成長帯として未分化に存在し、後に形成されるのが本来の節足動物の発生である。全ての現存する脊椎動物もまた、真の意味での幼生形を失った祖先脊椎動物より派生したと想定される。このような脊椎動物でも、Spemann, Mangold によって示されたように、囊胚初期の原口背唇部を移植して出来る2次軸は頭部であるが、囊胚後期の原口背唇部を移植して出来る2次軸は胴尾部である。従って、脊椎動物の体造りを個体発生学並びに系統発生学的に明らかにするには、何より頭部形成の機構が明らかにされなければならない。

頭部は前後軸に沿って最吻側の構造物で、その形成は前後軸形成と密接不可分である。前後軸の形成・頭部誘導機構、上述の3つの領域から体を形成する機構、また、脳が前脳と中脳、前脳が終脳と間脳に領域化する機構は、すべての現存する脊椎動物に共通すると想定される。しかし、海で生まれた（カンブリア紀）脊椎動物の先祖が、川に逃れて栄え（デボン紀）、陸上に進出して水辺で両棲生活し（石炭紀）、羊膜を発明して水辺を離れ陸上を制覇したのち（ジュラ紀）、新世代に哺乳動物の

隆盛を迎えるまで、脊椎動物はその生活形態と対応して発生過程を様々に修飾してきた。原初脊椎動物は極めて小さな動物であったと想定されるが、体を大きくするため発生に必要な栄養分、エネルギー源を卵黄として卵にため込んだ。しかし卵黄の存在は、卵割、ひいては3胚葉形成、前後軸・背腹軸形成の機構を大幅にデフォルメさせざるを得なかった。中程度に卵黄をため込んだ両棲類は放射相称状に不等卵割し原口形成部位を赤道軸方向に移動させ、大量の卵黄をため込んだ魚類と爬虫類、鳥類は卵の表面で左右相称に盤割し、魚類ではエビボリー/シールド形成による囊胚形成を、爬虫類、鳥類では原口を溝として（原条）囊胚形成するようになった。爬虫類での羊膜形成も囊胚形成までの過程を修飾することによって達成された。挙げ句の果て哺乳動物では、体を大きくするため卵黄をため込む道を放棄し、母胎から発生に必要な栄養分とエネルギー源を得る道を編み出したが、このための胚体外の組織も囊胚形成に至る道筋を修飾することによって達成されたものである。すなわち脊椎動物は進化の過程で初期発生過程を大幅に修飾しており、脊椎動物の前後軸形成、頭部形成の共通基本機構はその裏に隠されてみえにくい。

脊椎動物はまたその進化の過程で四肢など新たな所産を生み出した。その中でもヒト終脳は生物体最高の所産といえる。その形成はどの様に可能となったのであろうか。脳は嗅覚、視覚などの感覚器からの情報を統合制御し運動に結びつける構造物であり、感覚器の誕生が脳の誕生に先立つ。原始海の中の動物の主たる情報源は嗅覚であり、魚の大脳は嗅覚を司る古皮質に他ならない。脊椎動物の地上への進出とともに視覚、聴覚が情報源として大きな位置を占めるようになり、これと対応して古皮質の背側に原皮質が、腹側に古皮質が生まれた。陸上生活に適応した脳の発達とともに原始的爬虫類で基底核は腹側で大脳の内部にもぐり込み、高等な爬虫類で原皮質と古皮質の間に新皮質が生まれた。6層構造の形成などは乳類で新皮質の劇的な発達により、古皮質も背側で大脳の内部にもぐり込んだ。

頭部神経堤細胞がつくる頭蓋骨と脳神経についても脊椎動物進化にともなう劇的変遷過程をみてとることが出来る。脊椎動物は原初顎のない魚として存在した。内臓骨格は最初鰓を支える構造物として間接化せず存在した。脊索の前方に膨らむ脳を支えるため、三叉神経視神経枝と対をなす顎前弓由来の梁軟骨が用いられ、ついでその他の内臓骨格が間接化することによって顎をもつ魚が誕生した。この時顎の噛む力を制御するため三叉神経中脳路が生まれた。舌骨弓は顎骨弓を間接化して作った下顎、上顎を頭蓋骨に固定するための装置として使われた。しかしそ後の進化の過程で、顎骨は皮骨によって置き換えられ、顎骨弓は地上生活に適応した音を聞くための装置、耳小骨へと劇的変遷を遂げた。この様な顎骨弓の劇的変遷は何故可能であったのか。

Hox群遺伝子の発見によって、体幹部及び菱脳・鰓弓部の前後軸に沿った体造りは、同群遺伝子の入れ子式発現によってもたらされる位置価に応じてなされるとの基本概念が提示された（Hoxコード）。しかしロンボメラー2番より前の領域にはHox遺伝子は発現せず、頭部形成機構は生物学の中心課題でありながら、その複雑さと分節的形成様式の明瞭でないことなどから永らく未知の領域として残ってきた。

・当初の研究目的・計画とその達成度

以上に述べた視点の下、本研究では、Otx, Emx ファミリーの遺伝子を中心とする、変異マウス作成などによる発生遺伝学的解析により、哺乳動物における①前後軸形成・頭部誘導、②原脳形成、③

前脳と中脳への領域形成、④終脳と間脳への領域化、⑤原皮質形成、⑥皮質層構造の形成、⑦頭部神經堤細胞の機能の基本分子機序を明らかにすることを計画し、下記に述べるようその目的を達成することが出来た。特に Otx2 は頭部形成の各段階、各部位で中心的役割を果たすことが明らかとなり、各時期・部位 (epiblast, visceral endoderm, anterior mesendoderm, anterior neuroectoderm, midbrain, forebrain, cephalic neural crest cells) での Otx2 発現を規定するエンハンサーを上流 1 90 kb、下流 110 kb に渡ってそれぞれ独立に同定することが出来た。また、作成した各変異マウスを用いて、発現の変化する候補下流遺伝子を収集した。今後の研究は、これらを対象として、頭部形成に働く上流因子、下流因子、協働因子を同定し、頭部形成の遺伝子カスケード解明へと研究を展開する段階に達した。

頭部形成機構の解明は生物学の中心課題でありながら、その複雑さと分節的形成様式の明瞭でないことなどから永らく未知の領域として残されていた。しかしマウス、ニワトリ、カエルゼブラフィッシュに渡って萌芽期とも呼ぶべきこれまでの研究期間を経て、現在頭部形成研究は急激な研究展開を見せつつある。他のモデル動物での研究も、遺伝子間のネットワーク、上流・下流の遺伝子カスケード解明へと展開することが確信され、これらの研究と相俟って、脊椎動物の進化の過程を通じて、保たれた頭部形成の基本機構とデフォルメのための機構という生物学的一大課題に、本研究が発展することを強く期待している。

・これまでの主な研究成果

(1) 前後軸形成・頭部誘導 (図 1-3)

着床直後のマウス胚で原始内胚葉 (VE) は、形態的にもまたトランスサイレチン (TTR) を発現するなど分子的にも胚体外の性質を持つ (図 1)。エピプラスト (胚体外胚葉) は未分化性を規定する Oct4 の他、Otx2 及び Cripto を一面に発現する。Otx2 及び Cripto の発現は最初弱いが、これが上昇するとともに最も遠位部の VE (DVE) に一群の Otx2 陽性の細胞が誘導され、これと相俟って VE に胚体部分が誘導され、またトロフェクトダームから胚体外外胚葉が発達する。エピプラストでの Otx2 と Cripto の働きが失われると、DVE、胚体部分の VE、胚体外外胚葉が誘導されない (図 1)。また、この様な胚のエピプラストは早期に未分化性 (Oct4) を失い、神経外胚葉へ分化 (Sox1) する。後述する様に Otx2 と Cripto はそれぞれヘッドオーガナイザー、トランクオーガナイザーの形成もしくは機能を担うものであるが、この両者が欠損したとき形成される神経外胚葉はロンボメラー 1 / 2 (r1/2) の性質のみを持ち、我々はこの結果から r1/r2 領域を哺乳動物のボディプランにおける基底状態と提案した (図 3)。

正常発生に於いて、誘導された DVE では Otx2 等一連の遺伝子が誘導され、DVE は近接するエピプラストに働いて Cripto など一連の後方遺伝子 (PrE 遺伝子) の発現を抑制する (図 1)。この結果エピプラスト近位部における PrE 遺伝子、原始内胚葉遠位部における DVE 遺伝子の発現として、前後軸は最初遠近軸と一致して形成される。ついで DVE 細胞が将来の吻側に移動し吻側原始内胚葉 (AVE) を形成、これに伴って PrE 遺伝子は将来の尾側、原条形成部位で発現するようになり、この軸回転によって最終的な前後軸が形成される。DVE での Otx2 発現がなくても DVE は形成されるが、DVE の移動と DVE/AVE による近接するエピプラストでの PrE/PoE 遺伝子発現の抑制に Otx2 は必須

に働き、この働きが失われると頭部を欠損する胴体だけの胚となる（図2）。即ち、AVEは後方化シグナルを抑制することによって、将来エピプラストで頭部となる領域を確保することに働く。この後、尾側部エピプラストに原条が形成され、これより生じる吻側胚体内中胚葉（AME）はこの領域に働いて吻側神経外胚葉（Six3, Otx2 等）を誘導する。即ち吻側神経外胚葉は AVE による permissive なシグナルと AME による instructive なシグナルの2段階によって形成される（図2）。

吻側神経外胚葉の誘導に関しては、Spemann らによるモデル（表皮外胚葉に対して神経外胚葉一般が先ず誘導され、ついで前方化シグナルと後方化シグナルの拮抗として各部分が形成される）と、Newkoop 等によるモデル（神経外胚葉は最初吻側の性質を持って形成され、ついで後方化シグナルにより後方部分が形成される）があるが、我々の結果は r1/2 を基底状態として、ヘッドオーガナイザー（AVE/AME）とトランクオーガナイザー（原条）がそれぞれ吻側に頭部を、尾側に体幹部を形成するというモデルを意味する（図3）。

エピプラストで Otx2 と Cripto の下流にあって DVE, 胚体部分の VE, 胚体外外胚葉を誘導する因子、 AVE からの permissive なシグナル、 AME からの instructive なシグナルを同定することが今後の最重要課題である。

（2）脳の領域形成（図4－7）

AME による instructive なシグナルで誘導された吻側神経外胚葉でも Otx2 が発現する。この Otx2 の機能が失われると吻側神経外胚葉（原脳）は一旦誘導されるものの、まもなく失われ、原脳を欠損したマウスとなる。即ち Otx2 は誘導された吻側神経外胚葉の維持に働き、誘導自体には関わらない。AME からのシグナルを受けて吻側神経外胚葉の誘導に関わる遺伝子の同定は今後の課題である。

成立した原脳の後方境界は将来の中脳と後脳の境界に一致し、この境界には峠が形成されるが、この境界は Otx2 と Gbx2 の拮抗的作用によることが他のグループにより明らかにされた。また、峠では Fgf8 など一連の遺伝子が発現し中脳形成に local organizing center として働くことが他のグループによる一連の研究で明らかにされている。

原脳はまず中脳と前脳に、ついで前脳は間脳と終脳に領域化するが、Otx2 は Otx1 と 4－5 体節期に協働して中脳領域の形成に必須に働く（図5）。その下流で Pax2/Pax5, En1/En2, Wnt1 が働くが、中脳形成におけるこれらの遺伝子の関係の詳細は今後の課題である。

Otx2 は一方 Emx2 と協働して前脳領域の形成に働く。即ち、Otx2/Emx2 ダブル変異マウスでは archipallium, ventral thalamus, dorsal thalamus, anterior prepectum が欠損し、これらの領域は prosomeric model が提唱する p1-p4 領域と対応する（図5）。第一に注目すべきは p1 prepectum のうち欠損するのは precommisure 部分のみで、commissure 部分はほぼ正常に発生する。これに対し、commissural prepectum の形成には特異的に Emx2 発現の抑制が必須であることが、Otx2 遺伝子座に Emx2 をノックインしたマウスを作成することによって明かとなった。次に注目すべきは、間脳の領域化が形態的にも明瞭となる E11.5 では p1 precommissural prepectum, p2 dorsal thalamus で Emx2 が発現しないにも関わらず、二重変異マウスでこの領域が形成されないことである。二重変異マウスでの間脳の欠損は、3－4 体節期での lateroventral forebrain primordium での Emx2 発

現を反映しており、この発現領域に将来の ventral thalamus, prepectum が含まれ、commissural prepectum の発生のため Emx2 発現がこれらを生み出す細胞で 2 次的に抑制されると我々は想定している。しかし、色素注入によっては 3 - 4 体節期での Emx2 陽性細胞が ventral thalamus, prepectum を生じるか否か明かでなく、遺伝学的手法を用いて細胞系譜を明らかにすることが今後の課題である。

第 3 に注目すべきことに中脳を欠損する Otx1/Otx2 変異体のみならず、間脳を欠損する Emx2/Otx2 変異体でも r1/2 領域が拡大する。上に述べた r1/r2 を哺乳動物ボディプランにおける基底状態とする提案と相俟って、我々は r1/r2 を含む吻側部が、神経外胚葉の最初の発生段階では 1 つの単位として発生することを提案した（図 4）。実際、形態上吻側部で最初に現れる仕切は、3 - 4 体節期における preoticsulcus で、これは将来の r2 と r3 の境界に対応する。

原皮質の領域決定は上述のように 3 ~ 4 体節期 Otx2 と Emx2 の協働作用によるが、その後この領域が実際に原皮質になるかどうかは、9.5 日 Emx2 と Emx1 との協働による（図 6）。この時 Emx2 と Emx1 は、Wnts, BMPs を発現し原皮質 subfield の形成にシグナリングセンターとして働くと想定される cortical hem の形成と、これに隣接する原皮質でシグナルを受ける Lrf/Tcf 及び Lhx 遺伝子の発現を支配する（図 6）。

新皮質は哺乳動物に特徴的な構造で 6 層構造を形成する。これまでの解析より新皮質領域の形成は Otx, Emx ファミリーの遺伝子とは別の機構によると考えられ、その解明は今後の課題である。しかし Otx, Emx ファミリーの遺伝子は皮質層構造の形成にも働く（図 7）。皮質層構造の形成はまず将来の marginal zone と subplate 形成する pioneer neurons が preplate を形成することに始まり、後から生まれる cortical plate を形成する細胞が、preplate に割り込んで marginal zone と subplate を分ける。この際 cortical plate を形成する細胞は marginal zone を構成する Cajal-Retzius 細胞が分泌するリーリンに導かれて、radial glia fiber に沿って上昇する。Emx2 と Emx1 は pioneer neurons のうち Cajal-Retzius 細胞と subplate neurons の形成に必須で、両者の欠損により皮質層構造は形成されない。層構造の形成におけるファミリーの他の遺伝子の協働作用については現在解析中である。

(3) 頭部神経堤細胞

前後軸に沿って各部位に規則的に生じる神経堤細胞は、各部位で末梢神経と内臓骨格を対に形成する。頸骨弓と対を成す三叉神経は、視神経枝、上顎枝、下顎枝の三枝をもち、これらを一番前の内臓骨格、脳神経とする考え方が一般的である。しかし、下等動物では視神経枝は独立の根をもつ。

Otx2 は移動期にある中脳、前脳の神経堤細胞で発現し、その一部は頸骨弓にも流入する。この頭部神経堤細胞での Otx2 機能が欠損すると、三叉神経の第一枝と神経頭蓋及び下顎が特異的に欠損する。哺乳動物で下顎は中脳由来の頭部神経堤細胞が作る皮骨に由来する。内臓骨格は元来は鰓を支える 1 本の支柱であった（無顎類）が、これが間接化することによって顎が形成された（有顎類）。即ち、間接化した頸骨弓は上顎、下顎として機能したが、脊椎動物進化の過程で、顎としての機能を皮骨成分によって置き換え、陸上動物では音を聞くための装置、耳小骨へと転換した。

神経堤細胞での Otx2 機能の欠損による表現型は、Hoxa2 欠損マウスの表現型と相補的である。即ち、r3、舌骨弓より尾側に発現する Hoxa2 の欠損マウスでは、予想したように舌骨弓の骨要素が

頸骨弓の骨要素に転換・重複するが、この時下顎の形成・重複のみは認められない (Ujili ら)。このことは神経提細胞の genetic code とし頭部を *Otx2* が、体幹部を Hox 群遺伝子が支配し、両者の発現の認められない *r1/2* 由來の神経提細胞（頸骨弓）を基底状態と考えることになり、上に述べた神経外胚葉で *r1/2* を基底状態する主張と一致する。更にこの主張は、下等動物の梁軟骨に相同な神経頭蓋を、頸骨弓の更に前にある内臓骨格、頸前弓として、独立な視神経枝と対をなすと考えることになる。これは 1874 年に 提唱された Huxley の考えに他ならない。

・原著発表論文一覧

Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S. (1996). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes & Dev.* 9, 2646-2658.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T. and Aizawa, S. (1996). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formationin cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.

Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. and Mishina, M. (1996). Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation and hippocampal LTD in NMDA receptor E2 subunit mutant mice. *Neuron* 16, 333-344.

Yasunaga, M., Yagi, T., Hanzawa, N., Yasuda, M., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., Aizawa, S., Miyauchi, Y. and Nishikawa, S. (1996). Involvement of Fyn tyrosine kinase in progression of cytokinesis of B lymphocyte progenitor. *J. Cell Biol.* 132, 91-99.

Ilic, D., Kanazawa, S., Fruta, Y., Yamamoto, T. and Aizawa, S. (1996). Impairment of mobility in endodermal cells by FAK-deficiency. *Exp. Cell Res.* 222, 298-303.

Kanazawa, S., Ilic, D., Hashiyama, M., Noumura, T., Yamamoto, T., Suda, T. and Aizawa, S. (1996). p59 fyn and p125FAK Cooperation in Development of CD4+CD8+ Thymocytes. *Blood* 87, 865-870.

Kanazawa, S., Ilic, D., Hashiyama, M., Okada, M., Nomura, T., Aizawa, S. and Suda, T. (1996). Impaired development of CD4+ CD8+ thymocytes by csk- "knock-in" into fyn locus. *Oncogene* 13, 199-204.

Kato, M. V., Sato, H., Tsukada, T., Ikawa, Y., Aizawa, S. and Nagayoshi, M. (1996). A follistatin-like gene, mac 25, may act as a growth suppressor of osteosarcoma cells. *Oncogene* 12, 1361-1364.

Ishizaki, K., Nishizawa, K., Mimaki, S. and Aizawa, S. (1996). UV-induced mutations of supF gene on a shuttle vector plasmid in p53-deficient mouse cells are qualitatively different from those in wild-type cells. *Mutation Res.* 364, 43-49.

Enokido, Y., Araki, T., Aizawa, S. and Hatanaka, S. (1996). p53 involves cytosine arabinoside-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters* 203, 1-4.

Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y. and Kadokawa, T. (1996). Insulin signalling and actions in the muscles and liver of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3074-3084.

Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S. and Ruoslahti, E. (1996). Induction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for src family kinase. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2606-2613.

Enokido, Y., Araki, T., Tanaka, K., Aizawa, S. and Hamada, H. (1996). Involvement of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in postmitotic CNS neurons. *European Neurosci.* 8, 1812-1821.

Shimoji, M., Itoh, S., Toide, K., Nakayama, K., Aizawa, S. and Kamataki, T. (1996). Application of primary hepatocytes from p53-knockout mice for studies of expression of Cyp3_. *J. Biochem.* 120, 42-48.

Hamaguchi, I., Yamaguchi, N., Suda, J., Iwama, A., Hirao, A., Hashiyama, M., Aizawa, S. and Suda, T. (1996). Analysis of CSK homologous kinase (CHK/HYL) in hematopoiesis by utilizing gene knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 172-179.

Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. and Taniguchi, T. (1996). Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 382, 816-818.

Hamasaki, K., Mimura, T., Morino, N., Furuya, H., Nakamoto, T., Aizawa, S., Morimoto, C., Yazaki, Y., Hirai, H. and Nojima, . (1996). Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130CAS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 338-343.

Nakayama, T., Toguchida, J., Wadayama, B., Kaneo, H., Aizawa, S., Sasaki, S. and Nakamura, T. (1996). Fracture healing is a process independent of p53 function. *In vivo* 10, 553-558.

Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K. and Aizawa, S. (1996). Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 10662-10667.

Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y. and Sato, E. (1996). Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction* 55, 1315-1324.

Suda, Y., Matsuo, I., Kuratani, S. and Aizawa, S. (1996). *Otx1* function overlaps with *Otx2* in development of mouse forebrain and midbrain. *Genes to Cells* 1, 1031-1044.

Kadowaki, T., Tamemoto, H., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamauchi, t., Satoh, S., Sekihara, H., Aizawa, S. and Yazaki, Y. (1996). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1 and identification of insulin receptor substrate-2. *Diabetic Medicine* 13, 103-108.

Ohashi, M., Hatakeyama, K., Aizawa, S. and Kominami, R. (1996). P53 gene deficiency does not enhance instability of mouse minisatellites in somatic cells of normal tissues. *Jap. J. Cancer Res.* 87, 696-701.

Yoshida, M., Suda, Y., Matsuo, I., Miyamoto, N., Takeda, N., Kuratani, S. and Aizawa, S. (1997). *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124, 101-111.

Kuratani, S., Ueki, T., Aizawa, S. and Hirano, S. (1997). Peripheral Development of