

멍게 배발생 과정에서 중배엽 형성과 패턴화

김길중[†] · 니시다 히로키¹

강릉대학교 해양생명공학부, ¹일본 동경공업대학 생명과학과

Mesodermal Formation and Patterning during Ascidian Embryogenesis

Gil Jung Kim[†] and Hiroki Nishida¹

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

¹Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501, Japan

ABSTRACT : In ascidians, a primitive chordate, maternal cytoplasmic factors and inductive interactions are involved in the specification of cell fates in early embryos. The larval structure of ascidians is relatively simple, and the major mesodermal tissues of the tadpole larva are notochord, muscle, and mesenchyme. Formation of muscle cells is a cell-autonomous process, and localized maternal *macho-1* mRNA specify muscle fate in the posterior marginal zone of the early embryo. In contrast, inductive influence from endoderm precursors plays important roles in the specification of notochord and mesenchyme fates. FGF-Ras-MAPK signaling is involved in the induction of both tissues. The difference in responsiveness of the posterior mesenchyme and anterior notochord precursors to FGF signaling is caused by the presence or absence of intrinsic factors that inherited from the posterior-vegetal egg cytoplasm, respectively. In these inductions, directed signal polarizes the induced cells and promotes asymmetric cell divisions to produce two daughter cells with distinct fates.

Key words : Ascidian embryogenesis, Mesoderm formation, Embryonic induction, Ooplasmic determinants, Fibroblast growth factor, Cellular responsiveness.

요약 : 원시적인 척삭동물인 멍게에서 초기 배 세포운명은 모성 세포질인자와 유도적 상호작용에 의하여 결정된다. 매우 단순한 구조를 하고 있는 멍게 올챙이형 유생의 주요한 중배엽 조직으로 척삭, 근육 및 간충직이 존재한다. 근육 세포의 형성은 세포의 자율적인 과정으로, 초기 배의 후부 가장자리에 국재하는 모성 *macho-1* mRNA에 의하여 근육 세포의 운명이 결정된다. 이에 반하여, 내배엽 전구세포의 유도작용은 척삭과 간충직 세포의 운명결정에 있어서 중요한 역할을 한다. FGF-Ras-MAPK 신호전달 과정은 이들 조직의 유도에 관여한다. 간충직과 척삭 전구세포에서 FGF 신호에 대한 반응성의 차이는 난자의 후방 식물극 세포질에서 유래하는 인자의 존재 또는 부재에 의하여 야기된다. 간충직과 척삭 세포의 유도에 있어서, 지시적인 신호는 유도신호를 받은 세포를 극성화하고, 서로 다른 세포운명을 가진 두 개의 딸세포가 형성되도록 비대칭 세포분열을 촉진한다.

서론

멍게는 척삭동물문에 속하는 하등 무척추동물로, 올챙이 모양을 하고 있는 유생은 척추동물의 원시조상과 유사한 형태를 하고 있는 것으로 추측된다(Satoh, 1994; Jeffery, 2001; Corbo et al., 2001; Nishida, 2002). 유생기에 일시적으로 동체 후부에서 미부 말단에 이르는 위치에 척삭을 가지며, 그 상부에 척추동물 신경관의 원형으로 생각되는 신경삭을 형성

한다. 멍게는 오래 전부터 발생생물학의 실험재료로 사용되어 왔으며, 모자이크 발생을 하는 대표적 동물로 알려져 왔다. 특히, 근육 세포의 형성을 결정하는 모성 세포질 결정인자는 유명하다(Conklin, 1905; Nishida & Sawada, 2001). 멍게 배 발생 과정의 특징으로 원장합입 시기의 배를 구성하는 소수의 세포(110개 전후), 개체간에 차이를 보이지 않는 난할 양식, 그리고 유생기까지 발생이 비교적 빠른 것을 들 수 있다. 초기 배 발생 단계까지 세포계보가 완벽하게 조사되었고, 각 구성 세포들의 분화 표지들도 다양하게 준비되어 있다(Nishida, 1987; Satoh, 1994). 멍게 배는 110세포기 정도의 초기 발생 단계까지는 비교적 용이하게 할구를 분리할 수 있으며, 분리한 할구들을 재결합하여 세포분화를 단일 세포 수준

[†]교신저자: 강원도 강릉시 지변동 123, 강릉대학교 생명과학대학 해양생명공학부. (우) 210-702, (전) 033-640-2415, (팩) 033-640-2410, E-mail : gjkim@kangnung.ac.kr

에서 해석할 수 있다. 최근, 여러 연구자들에 의하여 계몽 프로젝트가 수행되어 발생생물학 연구의 모델동물로 앞으로 비약적인 발전이 기대된다(Dehal et al., 2002).

멍게 110세포배를 구성하는 대부분의 할구는 하나의 조직을 형성하도록 발생운명이 결정되어 있다. 이때의 각 할구를 분리하여 부분배로서 배양하면, 예정된 운명을 따라 조직분화가 일어난다. 멍게 유생의 주요한 증배엽 조직으로 척삭, 근육 및 간충직 세포를 들 수 있다. 원장합입 직전, 배의 식물반구 가장자리에 증배엽 전구세포들이 위치하고, 중앙에 내배엽 전구세포가 자리한다. 본 논문에서는 멍게 배발생 과정에서 모성 세포질 결정인자와 유도적 상호작용에 의하여 증배엽의 형성과 패턴화가 이루어진다는 것을 보고한다.

1. 모성 *macho-1* mRNA는 근육세포의 운명을 결정한다.

멍게 유생의 미부에는 척삭 좌우 양측에 근육 세포가 존재하여 부화 이후부터 고착 전까지 유영생활을 가능하게 한다. 이들 근육 세포의 대부분(1차 근육 세포)은 8세포기의 식물반구 후방할구(B4.1)에서 유래한다(Fig. 1). 나머지 근육세포(2차 근육 세포)들은 유래가 다르며, 세포분화에 있어서도 유도작용을 필요로 한다(Nishida, 1987, 1990). Conklin(1905)에 의하여 근육 세포의 발생운명은 난자의 특정 세포질 영역에 존재하는 인자에 의하여 결정된다는 것이 이미 100여년 전에 시사되었다. 이후 많은 연구자들에 의한 실험, 예를 들어 수정 이후 연속적인 배세포 해리 실험 및 각 세포기에서 근육 전구세포의 분리실험 등에 의하여 1차 근육 세포의 분화는 세포의 자율적인 과정으로 결정된다는 것이 밝혀졌다(Reverberi & Minganti, 1946; Whittaker, 1982; Nishida, 1992a). 즉, 8세포기에서 110세포기까지 각 단계에서 근육 전구세포를 분리하여 세포간 상호작용이 일어나지 않도록 한 후 배양하여도 1차 근육 세포의 분화는 일어난다. 또한, 난자 및 8세포배의 다양한 세포질을 부분적으로 절제하여 표피세포로 분화할 운명의 할구(근육세포의 운명은 가지지 않음)에 이식하는 실험을 통하여 근육세포 결정인자의 분포가 조사되었다(Nishida, 1992b). 근육 세포의 결정인자는 난자의 후방 식물극 세포질(posterior-vegetal cytoplasm; PVC) 영역에 위치하며, 8세포기의 B4.1 할구로 전달된다. PVC가 제거된 난자에서 발생한 배는 근육 세포의 형성이 억제되었다(Nishida, 1994). 따라서, PVC영역에는 근육세포 분화에 필요한 인자가 존재하고 있음이 증명되었다.

최근 근육세포 결정인자의 유력한 후보로서 *macho-1* 유전자가 클로닝되었다(Nishida & Sawada, 2001). whole-mount *in situ* hybridization에 의한 *macho-1* mRNA의 분포는 세포질 이

식 실험에 의하여 조사된 것과 일치하였다. 즉, *macho-1* mRNA는 난자의 PVC 영역과 일치하는 분포를 보였으며, 8세포기에는 B4.1할구에 국재했다. *macho-1* mRNA를 과잉발현시킨 배에서는 근육세포 분화가 과다하게 관찰되었다. *macho-1* mRNA에 대한 antisense oligonucleotide(phosphorothioate oligo)를 미수정란에 주입하여 모성 *macho-1* mRNA를 제거한 후, 수정하여 발생시킨 유생은 미부 형성에서 이상을 보였으며 근육 세포가 거의 형성되지 않았다. 일부 형성된 근육 세포는 유도적 상호작용에 의하여 만들어진 2차 근육 세포임이 확인되었다. 또한, 모성 *macho-1* mRNA가 제거된 난자에 *in vitro* 합성된 *macho-1* mRNA를 주입한 후 발생한 배에서, B4.1 할구를 분리하여 1차 근육세포의 형성을 조사한 결과 근육 세포의 분화가 일어났다. 더욱이, 모성 *macho-1* mRNA가 제거된 난자에서 근육세포 결정인자가 분포하는 세포질 영역을 절제하여 표피 전구세포에 이식하였을 때 근육세포의 형성이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는, *macho-1* mRNA가 근육세포 분화를 결정하는 모성 세포질 인자임을 증명한다.

2. 척삭과 간충직 세포의 형성은 유도적 상호작용을 필요로 한다.

앞서 근육 세포의 형성에서 살펴본 것처럼 멍게 배는 모자이크 발생 양식을 보이는 한편, 척삭과 간충직 세포의 형성에 있어서는 유도에 의한 조절적 발생 양식을 나타낸다. 간충직 전구세포를 8세포기에서 110세포기까지 각 단계에서 분리하여 부분배로 배양한 결과, 32세포기에서 유래한 부분배를 제외하고 간충직 세포의 분화가 관찰되었다(Kim & Nishida, 1999). 32세포기의 간충직 전구세포를 인접하고 있는 여러 할구들과 각각 재결합하여 배양한 결과, 내배엽 전구세포와 재결합되었을 때 간충직의 분화가 일어났고, 그 이외의 경우에는 나타나지 않았다. 이는 32세포기의 내배엽 전구세포에서 간충직 세포의 분화를 유도하는 신호를 방출하고 있을 가능성을 시사한다. 이와 같은 실험 결과는 척삭의 경우에 있어서도 매우 유사함을 보였다(Nakatani & Nishida, 1994). 즉, 32세포배에서 분리한 척삭 전구세포는 척삭 세포의 분화를 보이지 않았지만, 이를 내배엽 할구와 재결합시키면 척삭 세포의 분화가 일어났다.

내배엽 할구로부터 방출되어 척삭과 간충직 세포분화를 유도하는 유력한 후보로 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor; FGF)가 시사되었다(Nakatani et al., 1996; Kim et al., 2000). 단독으로는 척삭과 간충직 세포로 분화하지 않는 32세포기에서 분리한 각 전구세포를 FGF 단백질과 함께

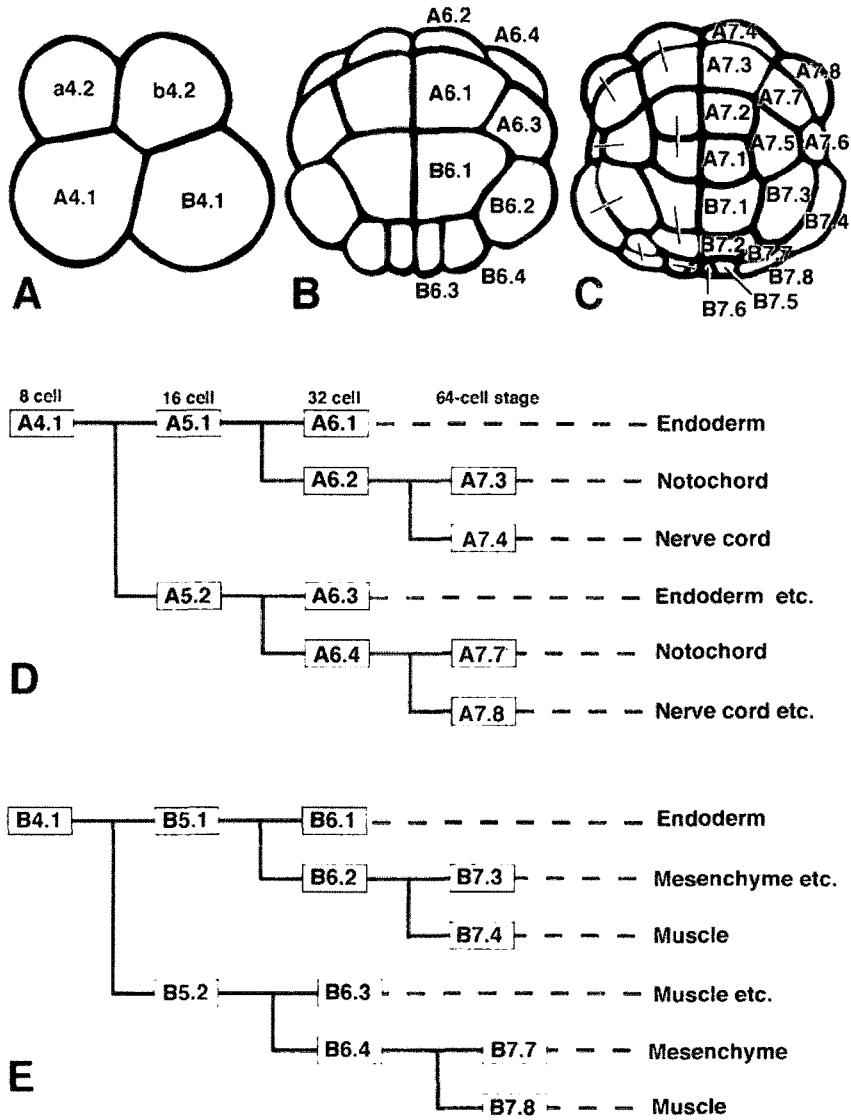


Fig. 1. Diagram showing the fates of cells and lineage trees in ascidian embryos. (A) The 8-cell embryo. Lateral view. Anterior is to the left. The name of each blastomere is indicated. (B) The 32-cell embryo. Vegetal view. Anterior is up. (C) The 64-cell embryo. Blastomeres connected with a bar are sister cells. (D and E) Lineage trees in the vegetal hemisphere. As development is bilaterally symmetrical, one side of the embryo is shown. (D) Lineage tree that is relevant to the primary notochord and nerve cord lineages and that starts from the anterior-vegetal (A4.1) blastomere of the 8-cell embryo. (E) Lineage tree starting from the posterior-vegetal (B4.1) blastomere, from which mesenchyme and primary muscle cells originate.

배양한 결과, 부분배를 구성하는 모든 세포가 각각 척삭과 간충직 세포로 발생하였다. 32세포기의 척삭 할구는 척삭 이외에 신경삭의 운명을, 간충직 할구는 근육의 운명을 함께 가지고 있다(Fig. 1. D, E). 과잉의 FGF 신호에 의하여 신경삭과 근육의 운명도 각기 척삭과 간충직으로 변경된 것이다. 척삭과 간충직 세포분화를 유도하는 인자가 FGF 신호라는 것은 FGF receptor-Ras-MEK(mitogen-activated protein, MAP, kinase kinase)-MAP kinase 신호전달 경로를 저해하는 실험들

을 통하여 확인되었다(Nakatani & Nishida, 1997; Kim & Nishida, 2001; Simauchi et al., 2001). 각 신호전달 과정이 억제될 경우, 척삭과 간충직 세포의 분화는 일어나지 않았고, 척삭과 간충직 전구세포는 각각 신경삭과 근육 세포로 발생되었다. 최근, 척추동물 FGF 4/6과 FGF 9/20 유전자에 대한 유령명계(*Ciona savignyi*)의 상동체(*Cs-FGF 4/6/9*)가 클로닝되었다(Imai et al., 2002). 유령명계 배에서 *Cs-FGF 4/6/9* 유전자의 발현은 16 및 32세포기의 내배엽 할구에서 나타났다.

morpholino oligo에 의한 *Cs-FGF 4/6/9* mRNA 파괴 결과, 간충직 세포의 분화는 일어나지 않았다. 그러나, 척삭 세포의 분화를 억제하는 효과는 부분적이어서 앞으로 보다 자세한 실험(예를 들어 본 논문에서 보고하는 대부분의 실험결과가 얻어진 우렁쟁이(*Holocynthia roretzi*)에서 FGF 유전자를 클로닝하여 비교, 연구하는 실험 등)이 요구된다.

3. 후방 식물극 세포질은 척삭과 간충직 전구세포의 유도 신호에 대한 반응성의 차이를 일으킨다.

멍게 초기 낭배의 식물반구 앞쪽 가장자리에 신경삭 전구세포가 자리하고, 뒤쪽 가장자리에 근육 전구세포가 위치한다. 식물극 중앙에 위치하는 내배엽 전구세포와 신경삭 사이에 척삭 전구세포가, 내배엽과 근육 사이에 간충직 전구세포가 자리한다(Fig. 1C). 앞에서 살펴본 바와 같이 척삭과 간충직 세포분화 과정은 매우 유사하다. 척삭 전구세포는 내배엽에 의한 유도가 일어나는 시기인 32세포기에 신경삭의 운명을 함께 가진다. 척삭의 유도가 일어나지 않으면 척삭 전구세포는 신경삭으로 분화하며, 32세포기에서 분리한 척삭(척삭-신경삭) 전구세포를 FGF로 처리하면 부분배를 구성하는 모든 세포가 척삭으로 분화된다(Nakatani et al., 1996; Minokawa et al., 2001). 32세포기의 간충직 전구세포에는 간충직의 운명과 함께 근육의 운명도 포함된다. 간충직 유도가 억제되면 간충직(간충직-근육) 전구세포는 근육으로 발생된다(Kim & Nishida, 1999). 32세포기의 간충직 전구세포를 FGF로 처리하면 근육의 분화는 억제되고, 간충직의 분화만이 관찰된다(Kim et al., 2000).

이러한 결과는, 척삭과 간충직의 분화에서 두 전구세포가 내배엽 할구의 유도신호에 대하여 반응할 때 어떠한 차이를 가진다는 가능성을 시사한다. 이를 확인하기 위하여 먼저, PVC를 제거한 후 척삭과 간충직 분화에 어떠한 변화가 일어나는지 조사하였다. PVC를 제거한 경우 간충직 세포의 분화는 일어나지 않았지만(근육세포의 형성 역시 억제됨), 척삭 세포는 원래의 위치와 간충직이 형성될 위치에 동심원상으로 과잉 형성되었다(Nishida, 1994; Kim et al., 2000). 이와 반대로 난자의 전방 식물극 세포질(anterior-vegetal cytoplasm; AVC)을 제거해도 척삭과 간충직 세포는 정상적으로 형성되었다. 절제한 PVC를 정상 난자의 전방 식물극 영역에 이식한 결과, 간충직 세포가 후방 영역은 물론 전방 영역에도 이소적(ectopic)으로 형성되었고(이소적 근육형성 역시 일어남), 척삭 세포의 분화는 억제되었다. 그러나, 절제한 AVC를 정상 난자의 후방 식물극 영역에 이식해도 척삭과 간충직의 형성은 영향을 받지 않았다. 또한, 내배엽 전구세포를 분리하

여 척삭과 간충직 전구세포와 각각 다양하게 재결합한 결과, 척삭과 간충직의 분화를 유도하는 내배엽의 능력에는 차이가 없음이 밝혀졌다(Kim et al., 2000). 32세포배에서 척삭-신경삭 전구세포는 전방계열(A-lineage)의 내배엽할구와 접하고 있으며, 간충직-근육 전구세포는 후방계열(B-lineage)의 내배엽할구와 접하고 있다. 32세포배에서 분리한 전방계열의 내배엽 전구세포는 척삭 뿐만 아니라 간충직 세포의 분화를 유도할 수 있었다. 또한, 후방계열의 내배엽 전구세포는 간충직 뿐만 아니라 척삭 세포의 분화를 유도할 수 있었다. 따라서, PVC를 가지는 식물반구 할구가 내배엽으로부터 유도신호를 받으면 간충직 세포로 분화하고, 같은 유도신호를 PVC를 가지지 못한 식물반구 할구가 받으면 척삭으로 분화한다는 것이 명확하게 되었다.

4. 지시적인 신호는 비대칭 세포분열을 유도한다.

척삭과 간충직 세포의 유도는 32세포기에 일어난다. 그러나, 앞서 지적했듯이 32세포기의 척삭 전구세포는 신경삭의 운명을 함께 가지며, 간충직은 근육의 운명을 함께 가진다. 이들은 다음 세포분열, 즉 64세포기(정확하게는 44세포기)에 각각의 운명으로 나뉜다. 이때, 언제나 내배엽과 접하는 위치에 척삭(전방)과 간충직(후방)이 유도되고, 반대쪽에 신경삭(전방)과 근육(후방)이 만들어진다(Fig. 1). 이것은 멍게 발생의 특징으로 척추동물의 경우처럼 많은 세포가 동시에 유도되어 하나의 발생운명을 나타내는 것과 구분된다.

32세포배의 간충직-근육 전구세포(B6.2)에서는 운명이 나뉘기 전에 근육특이적 유전자인 actin mRNA의 발현이 시작된다(Satou et al., 1995). 64세포배에서 actin mRNA의 발현은 근육 전구세포에서는 계속되지만, 간충직 전구세포에서는 곧 바로 억제된다. 32세포배에서 간충직-근육 전구세포를 분리, 유도신호를 받지 못하는 상황에서 1회 세포분열 후, actin mRNA의 발현을 조사하면 2개의 딸세포에서 모두 검출된다(Kim & Nishida, 1999). 32세포배의 간충직-근육 전구세포를 FGF가 존재하는 상황에서 배양하면, 2개의 딸세포 모두에서 actin mRNA의 발현은 검출되지 않는다(Kim et al. 2000). 이들이 모두 간충직 세포로 분화됨은 앞에서 언급하였다. 간충직-근육 전구세포에서 디폴트(default) 운명이 근육이고, 유도된 운명은 간충직이다. 또한, 간충직 할구가 유도없이 근육 세포로 분화되는 것에서 간충직할구에도 *macho-1* 단백질이 존재할 것으로 여겨진다. 따라서, *macho-1* mRNA가 증배업 패턴화를 좌우하는 PVC 인자일 가능성이 시사된다. 척삭-신경삭 전구세포의 경우에서도 유사한 실험결과가 관찰된다(Nakatani et al., 1996; Minokawa et al., 2001). 이 경우, 디폴트

운명은 신경삭이고, 유도된 운명은 척삭이다.

결론

이상의 결과에서 다음과 같은 멍게 중배엽 분화 모델이 시사된다. 32세포기의 내배엽 전구세포에서 방출되는 FGF(지시적인 신호)는 척삭-신경삭 전구세포와 간충직-근육 전구세포의 비대칭 분열을 일으킨다. 이는 FGF 신호에 의하여 변화된(아마 활성화된) 인자가 신경삭과 근육이 형성될 세포질 영역보다 척삭과 간충직의 형성 영역에 치우쳐 분포하는 것으로 야기된다고 추측된다. 본 모델의 타당성은 앞으로 활성화형 MAP kinase의 세포내 분포 조사와 중배엽 유도 능력을 가진 내배엽 전구세포를 신경삭과 근육 세포가 형성되는 위치에 강제적으로 이식하는 방법 등으로 밝혀지리라 생각한다.

인용문헌

- Conklin EG (1905) The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J Acad Nat Sci (Philadelphia)* 13:1-119.
- Carbo JC, Di Gregorio A, Levine M (2001) The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology. *Cell* 106:535-538.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, Davidson B, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM, Harafuji N, Hastings KE, Ho I, Hotta K, Huang W, Kawashima T, Lemaire P, Martinez D, Meinertzhagen IA, Necula S, Nonaka M, Putnam N, Rash S, Saiga H, Satake M, Terry A, Yamada L, Wang HG, Awazu S, Azumi K, Boore J, Branno M, Chin-Bow S, DeSantis R, Doyle S, Francino P, Keys DN, Haga S, Hayashi H, Hino K, Imai KS, Inaba K, Kano S, Kobayashi K, Kobayashi M, Lee BI, Makabe KW, Manohar C, Matassi G, Medina M, Mochizuki Y, Mount S, Morishita T, Miura S, Nakayama A, Nishizaka S, Nomoto H, Ohta F, Oishi K, Rigoutsos I, Sano M, Sasaki A, Sasakura Y, Shoguchi E, Shin-I T, Spagnuolo A, Stainier D, Suzuki MM, Tassy O, Takatori N, Tokuoka M, Yagi K, Yoshizaki F, Wada S, Zhang C, Hyatt PD, Larimer F, Detter C, Doggett N, Glavina T, Hawkins T, Richardson P, Lucas S, Kohara Y, Levine M, Satoh N, Rokhsar DS (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into Chordate and Vertebrate origins. *Science* 298:2157-2167.
- Imai KS, Satoh N, Satou Y (2002) Early embryonic expression of *FGF4/6/9* gene and its role in the induction of mesenchyme and notochord in *Ciona savignyi* embryos. *Development* 129:1729-1738.
- Jeffery WR (2001) Determinants of cell and positional fate in ascidian embryos. *Int Rev Cytol* 203:3-62.
- Kim GJ, Nishida H (1999) Suppression of muscle fate by cellular interaction is required for mesenchyme formation during ascidian embryogenesis. *Dev Biol* 214:9-22.
- Kim GJ, Nishida H (2001) Role of FGF and MEK signaling pathway in the ascidian embryo. *Dev Growth Differ* 43:521-533.
- Kim GJ, Yamada A, Nishida H (2000) An FGF signal from endoderm and localized factors in the posterior-vegetal egg cytoplasm pattern the mesodermal tissues in the ascidian. *Development* 127:2853-2862.
- Minokawa T, Yagi K, Makabe KW, Nishida H (2001) Binary specification of nerve cord and notochord cell fates in ascidian embryos. *Development* 128:2007-2017.
- Nakatani Y, Nishida H (1994) Induction of notochord during ascidian embryogenesis. *Dev Biol* 166:289-299.
- Nakatani Y, Nishida H (1997) Ras is an essential component for notochord formation during ascidian embryogenesis. *Mech Dev* 68:81-89.
- Nakatani Y, Yasuo H, Satoh N, Nishida H (1996) Basic fibroblast growth factor induces notochord formation and the expression of *As-T*, a *Brachyury* homolog, during ascidian embryogenesis. *Development* 122:2023-2031.
- Nishida H (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev Biol* 121:526-541.
- Nishida H (1990) Determinative mechanism in secondary muscle lineages of ascidian embryos: Development of muscle-specific features in isolated muscle progenitor cells. *Development* 108:559-568.
- Nishida H (1992a) Developmental potential for tissue differentiation of fully dissociated cells of the ascidian embryo. *Roux's Arch Dev Biol* 201:81-87.
- Nishida H (1992b) Regionality of egg cytoplasm that promotes muscle differentiation in embryo of the ascidian, *Holocynthia roretzi*. *Development* 116:521-529.
- Nishida H (1994) Localization of determinants for formation of

- the anterior-posterior axis in eggs of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 120:3093-3104.
- Nishida H (2002) Patterning the marginal zone of early ascidian embryos: localized maternal mRNA and inductive interactions. *Bioessays* 24:613-624.
- Nishida H, Sawada K (2001) *macho-1* encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* 409:724-729.
- Reverberi G, Minganti A (1946) Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di ascidie. Risultati dell'indagine sperimentale sull'uovo di *Ascidella aspersa* e di *Ascidia malaca* allo stadio di otto blastomeri. *Pubbl Stn Zool Napoli* 20:199-252.
- Satoh N (1994) *Developmental biology of ascidians*. Cambridge University Press, New York, pp 36-131.
- Satou Y, Kusakabe T, Araki I, Satoh N (1995) Timing of initiation of muscle-specific gene expression in the ascidian embryo precedes that of developmental fate restriction in lineage cells. *Dev Growth Differ* 37:319-327.
- Shimauchi Y, Murakami SD, Satoh N (2001) FGF signals are involved in the differentiation of notochord cells and mesenchyme cells of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 128:2711-2721.
- Whittaker JR (1982) Muscle lineage cytoplasm can change the developmental expression in epidermal lineage cells of ascidian embryos. *Dev Biol* 93:463-470.