

## 멍게의 수압수용체세포 형성에서 FGF와 MEK 신호의 역할

서 형 주 · 김 길 중<sup>†</sup>

강릉원주대학교 해양생명공학부

### Role of FGF and MEK Signaling in Formation of the Hydrostatic Pressure Receptor Cells during Ascidian Embryogenesis

Hyeong Joo Seo and Gil Jung Kim<sup>†</sup>

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

**ABSTRACT** : In most larvae of ascidian, two sensory pigment cells, otolith and ocellus, lie in their brain vesicle. They also have a third type of sensory cells: hydrostatic pressure receptor (Hpr) cells. The Hpr cells were presumed to be hydrostatic pressure-detection cells, but their precise functions is still disputed. In this study, we investigated whether an FGF signaling is involved in formation of Hpr cells. When fertilized eggs were injected with *Hr-FGF9/16/20* antisense MO, the resulting larvae showed severe abnormalities with no expression of the Hpr cell-specific Hpr-1 antigen. Similar results were obtained using an FGF receptor inhibitor, SU5402, and an MEK inhibitor, U0126. Embryos treated with SU5402 or U0126 during the 32-cell and hatching stages did not express the Hpr-1 antigen. To elucidate the temporal requirement for the FGF signaling in formation of Hpr cells, embryos were treated with SU5402 for 2 h, or U0126 for 20 min during various embryonic stages. Larvae treated with SU5402 from the 16-cell stage to the 64-cell stage did not express the Hpr-1 antigen, whereas those treated at the early gastrula stage expressed the Hpr-1 antigen. When U0126 treatment was carried out at various stages between the 8-cell and late gastrula stages, larvae scarcely formed the Hpr cells. They showed expression of the Hpr-1 antigen when embryos were placed in U0126 just before the neural plate stage. These results suggest that FGF9/16/20 signaling is involved in formation of Hpr cells from the primary neural induction stage to the late gastrula stage.

**Key words** : Hydrostatic pressure receptor, FGF signaling, Hpr-1 antibody, SU5402, U0126, Ascidian.

**요 약** : 멍게 유생의 뇌포에는 2개의 감각색소세포인 평형기와 안점 이외에 또 다른 감각세포로 추정되는 수압수용체세포가 존재한다. 수압수용체세포 형성에 관해서는 현재까지 거의 알려진 것이 없다. 본 연구에서는 수압수용체세포 형성에서 FGF 신호전달 과정의 관련성을 조사했다. 수정란에 *Hr-FGF9/16/20* antisense MO를 미세주입했을 때, 발생한 유생에서 수압수용체세포 특이적 Hpr-1 항원의 발현이 검출되지 않았다. 32세포기부터 FGF 수용체 억제제 SU5402 및 MEK 억제제 U0126을 처리한 배아도 수압수용체세포를 갖지 못한 유생으로 발생했다. 다음으로 수압수용체세포 형성에 FGF 신호전달 과정이 관련되는 시기를 자세히 조사했다. 수압수용체세포 형성에는 FGF 수용체 활성이 16세포기부터 64세포기까지 필요하다는 것이 시사되었다. U0126은 8세포기부터 후기 낭배기까지 Hpr-1 항원 발현을 억제했다. Hpr-1 항원 발현은 신경관기 직전부터 U0126의 영향을 받지 않았다. 따라서, 멍게에서 수압수용체세포 형성은 1차 신경유도기부터 후기 낭배기까지 FGF 신호전달 과정을 필요로 한다는 것이 밝혀졌다.

## 서 론

해산 무척추동물인 멍게 유생은 척삭동물문의 기본적인 체형을 나타낸다(Satoh, 1994). 멍게 배아 발생은 낭배기를 거쳐 신경관기, 신경배기로 진행되며, 척추동물과 같이 등쪽에

<sup>†</sup> 교신저자: 강원도 강릉시 강릉대학로 120 강릉원주대학교 생명과학대학 해양생명공학부. (우) 210-702, (전) 033-640-2415, (팩) 033-640-2340, E-mail: gjkim@gwnu.ac.kr

신경관 형성을 통하여 중추신경계를 만든다. 머리 부분에서 신경관은 팽창하여 뇌포(brain vesicle)를 형성하고, 뇌포 다음부터 꼬리 끝까지 척추동물의 척수에 해당하는 신경삭이 된다. 유생의 뇌포에는 색소를 함유하는 감각신경세포인 안점(ocellus)과 평형기(otolith)가 존재한다(Katz, 1983; Nicol & Meinertzhagen, 1991). 안점은 1개의 색소세포와 그 아래에 위치하는 3개의 렌즈세포 및 17개의 광수용세포로 구성된다. 평형기는 중력을 감지하는 신경세포로 1개의 거대한 색소과립을 갖는다. 또한, 유생의 뇌포에는 제3의 감각신경세포인 수압수용체세포가 존재한다(Eakin & Kuda, 1971; Katz, 1983; Nicol & Meinertzhagen, 1991; Taniguchi & Nishida, 2004; Kim et al., 2006). 뇌실 벽에서 수압수용체 세포는 뇌포 공동으로 섬모성 구형 돌기를 내밀고 있다. 돌기에는 소포체에서 유래한 것으로 추정되는 막성 관들이 밀집해 분포한다. 정확한 수압수용체세포 기능은 아직 밝혀지지 않았으나, 조직해부학적으로 볼 때 어류의 소관세포(coronet cells)와 유사성이 높은 것으로 추정된다.

멍게의 신경은 예정 외배엽에서 fibroblast growth factor (FGF)9/16/20에 의하여 활성화된 FGF 수용체가 Ras/MEK/Erk 신호전달 과정을 통하여 유도하는 것으로 보고되었다(Hudson & Lemaire, 2001; Kim & Nishida, 2001; Imai et al., 2002; Kumano et al., 2006). FGF9/16/20은 신경 유도가 시작되는 16세포기부터 예정 내배엽과 신경의 유도자로 알려져 있는 척삭 및 신경삭 전구세포에서 발현한다(Imai et al., 2002; Bertrand et al., 2003; Kumano et al., 2006). FGF 신호의 억제는 신경 유도를 방해한다. FGF 신호는 예정 신경세포에 낭배기까지 연속적으로 작용하여 신경세포를 점진적으로 특성화하는 것으로 추정된다. 척추동물에서 알려진 bone morphogenetic protein(BMP) 신호 억제에 의한 신경 유도는 멍게의 경우 기능하지 않은 것으로 추정된다(Darras & Nishida, 2001). 즉, BMP 및 chordin의 길항작용을 억제해도 멍게의 신경유도는 영향을 받지 않는다.

안점과 평형기 색소세포 형성에는 FGF 신호전달 과정이 관여한다(Kim & Nishida, 2001; Miya & Nishida, 2003; Kim, 2003). FGF 신호가 억제된 배아에서 뇌포는 물론 색소세포 형성도 관찰되지 않는다. 현재까지 수압수용체세포 형성과 관련된 분자 기전에 대한 보고는 거의 없다. FGF에 의한 1차 신경 유도 이후, 안점과 평형기 색소세포 분화 및 운명 결정에는 BMP-chordin 길항작용이 관여하는 것으로

알려졌다(Darras & Nishida, 2001). 이때 BMP 신호는 색소세포 운명 결정 이외에 수압수용체세포 형성을 억제하며 chordin은 과잉형성을 유도한다.

본 연구에서는 멍게 유생의 뇌포에 존재하는 수압수용체 세포 형성 과정에 FGF 신호가 관여하는지 조사했다. 또한, 수압수용체세포 형성에 FGF 신호전달 과정이 언제 필요한지 그 시기를 자세히 조사했다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

강원도 강릉 연안에 서식하는 자연산 멍게(우렁쟁이, *Halocynthia roretzi*)를 사용했다. 인공적으로 산란을 유도한 난자에 다른 개체에서 유래된 정자를 섞어 수정란을 얻었다. 직경 0.45  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 해수에 streptomycin(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가한 후 수정란을 옮겨 저온배양기에서 13°C로 사육했다. 수정란은 약 36시간 경에 올챙이형 유생으로 부화했다.

### 2. Morpholino Oligonucleotide의 미세주입

*Hr-FGF9/16/20* mRNA의 번역을 억제하기 위하여 개시 코돈 주변부에 대한 상보적인 염기서열을 갖는 morpholino oligonucleotide(MO; Gene Tools, Oregon, USA)를 제작했다(5'-TACCATTTGTACTGAAGGCATTTTC-3')(Kumano et al., 2006). 대조군 실험에는 표준 대조군 MO를 구입하여 사용했다. 각 MO는 1 mg/ml 농도의 Fast Green과 섞어 수정란에 약 300 pg 미세주입했다.

### 3. SU5402와 U0126 처리

FGF 신호전달 과정을 억제하기 위하여 배아를 2  $\mu\text{M}$  SU5402 (Calbiochem, San Diego, USA) 또는 2  $\mu\text{M}$  U0126(Promega, Madison, USA)을 포함한 바닷물에서 키웠다(Kim & Nishida, 2001). SU5402는 FGF 수용체의 단백질 인산화 영역에 결합하여 FGF 신호전달 과정을 억제하는 합성화합물이다(Mohammadi et al., 1997). U0126은 Raf에 의한 MEK 활성화 및 MEK에 의한 Erk 활성화 억제를 통하여 FGF 신호전달 과정을 방해하는 합성약물이다(Favata et al., 1998).

### 4. 면역조직화학염색

수압수용체세포 분화지표로서 단일클론성 항체 Hpr-1을 사용했다(Kim et al., 2006). Hpr-1 항체는 부화 직전의 미충형 유생기부터 수압수용체세포를 특이적으로 인식한다. 항체염색을 위한 유생 표본은  $-20^{\circ}\text{C}$  메탄올로 10분간 고정했다. 고정된 표본은 PBS로 세척 후, Hpr-1 항체 반응 및 TSA fluorescein system(PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA)을 이용하여 수압수용체세포 형성을 확인했다.

## 결 과

### 1. FGF 신호전달 과정은 수압수용체세포 형성에 관여함

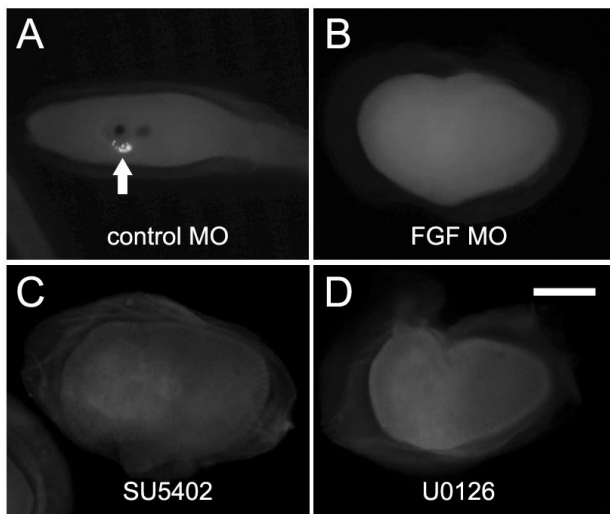
명계의 신경 유도와 뇌포 형성은 FGF9/16/20 신호에 의존하므로 뇌포에 존재하는 수압수용체세포 형성은 FGF 신호전달 과정의 영향 아래에 있을 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여 먼저 FGF9/16/20에 대한 antisense MO를 수정란에 미세주입했다. FGF antisense MO를 미세주입한 수정란은 대조군으로 control MO를 미세주입한 수정란이 유생으로 부화할 때까지 키웠다. 이전에 보고된 것 같이 FGF antisense

MO를 미세주입한 배아는 신경관 형성이 억제되었고, 꼬리의 신장과 뇌포의 형성이 관찰되지 않았다(Kumano et al., 2006)(Fig. 1B). 이들의 유생에서 수압수용체세포 형성을 수압수용체세포 특이적 Hpr-1 항원의 검출을 통하여 확인하였다. 그 결과, Hpr-1 항원 발현은 거의 확인되지 않았다(2%,  $n=47$ ; Fig. 1B). 이에 비하여 control MO가 주입된 유생은 Hpr-1 항원 발현이 뇌포 왼쪽 부위에서 관찰되었다(94%,  $n=32$ ; Fig. 1A).

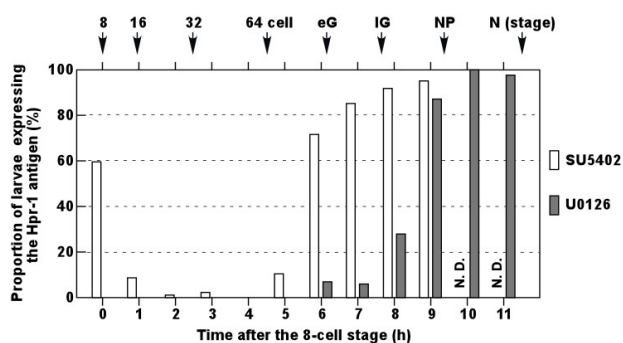
수압수용체세포 형성에 있어서 FGF 신호전달 과정의 관여를 명확하게 밝히기 위하여 FGF 수용체 특이적 저해제 SU5402와 MEK 특이적 저해제 U0126을 사용했다. SU5402와 U0126은 명계에서 FGF 신호전달 과정을 특이적으로 억제한다(Kim & Nishida, 2001; Hudson et al., 2003). 배아를  $2\ \mu\text{M}$  SU5402가 포함된 바닷물에서 32세포기부터 유생으로 부화할 때까지 키웠다. 그 결과, 꼬리의 신장과 뇌포의 형성이 관찰되지 않았으며, Hpr-1 항원 발현도 확인되지 않았다(0%,  $n=44$ ; Fig. 1C).  $2\ \mu\text{M}$  U0126에서 32세포기 배아를 키운 경우도 Hpr-1 항원 발현은 검출되지 않았다(0%,  $n=39$ ; Fig. 1D). 이러한 결과는 명계의 수압수용체세포 형성에 FGF 신호전달 과정이 관여한다는 것을 시사한다.

### 2. SU5402와 U0126에 대한 수압수용체세포의 반응 시기

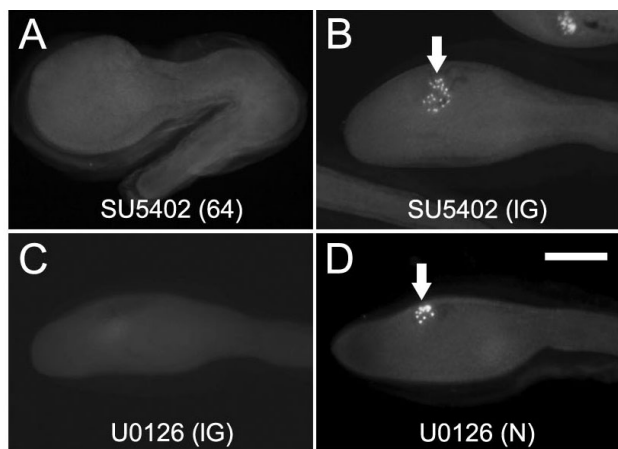
다음으로 수압수용체세포 형성에 FGF 신호전달 과정이 작용하는 자세한 시기를 조사했다. 8세포기부터 1시간 간격으로 배아를  $2\ \mu\text{M}$  SU5402 또는  $2\ \mu\text{M}$  U0126으로 처리했다. SU5402는 2시간 처리 후, U0126은 20분 처리 후 각각 바닷물로 3회 이상 세척했다(Kim & Nishida, 2001; Kim, 2003). 배아를 부화 때까지 키운 후, 수압수용체세포 형성을 Hpr-1 항원 발현으로 확인했다(Fig. 2). SU5402를 8세포기부터 2시간 동안 처리한 배아에서 Hpr-1 항원은 약 60%의 비율로 발현되었다. 그러나, 16세포기부터 64세포기까지의 배아는 SU5402 처리에 의하여 Hpr-1 항원 발현이 억제되었다(Fig. 3A). 초기 낭배기 직전(약 92세포기)부터 SU5402는 Hpr-1 항원 발현을 거의 억제하지 않았다(Fig. 3B). 따라서 수압수용체세포 형성에는 FGF 수용체 활성이 16세포기부터 64세포기까지 필수적이라는 것이 시사된다. U0126은 8세포기부터 후기 낭배기(약 180세포기)까지 Hpr-1 항원 발현을 억제했다(Fig. 3C). 그러나, 신경관기 직전부터 Hpr-1 항원 발현은 U0126에 영향을 받지 않았다(Fig. 3D). 따라서, 수압



**Fig. 1. Expression of the hydrostatic pressure receptor-specific Hpr-1 antigen in *Halocynthia* larvae.** (A) Larva injected with 300 pg of control universal MO at the 1-cell stage. Anterior is to the left. Dorsal view. Arrow indicates expression of the Hpr-1 antigen in the left cavity of the brain vesicle. (B) Larva injected with 300 pg of antisense *Hr-FGF9/16/20* MO at the 1-cell stage. (C, D) Larvae treated with SU5402 (C), or U0126 (D) from the 32-cell to hatching stages. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 2.** Results of experiments designed to examine the periods of sensitivity to SU5402 and U0126 in the Hpr cells formation. Formation of Hpr cells was estimated by detecting expression of the Hpr-1 antigen in the resulting larvae. Embryos were treated with SU5402 for 2 h or U0126 for 20 min at each time point (intervals of 1 h) from the 8-cell stage to the neurula stage. Above the x-axis, embryonic stages were indicated. At least 30 embryos were scored for each time point; eG, early gastrula; IG, late gastrula; NP, neural plate; N, neurula; N.D., not determined.



**Fig. 3.** Expression of the Hpr-1 antigen on FGF signaling-blocked larvae. Anterior is to the left. Lateral views. Arrows indicate expression of the Hpr-1 antigen. (A, B) larvae treated with SU5402 for 2 h at the 64-cell stage (A), or at the late gastrula (IG) stage (B). (C, D) Larvae placed in U0126 for 20 min at the IG stage (C), or at the neurula (N) stage (D). Scale bar = 100  $\mu$ m.

수용체세포 형성에 MEK 신호전달과정은 1차 신경유도기 (16세포기부터 시작) 이전부터 후기 낭배기까지 필요하다는 것이 시사된다.

## 고 찰

명계에서 수압수용체세포 형성은 FGF 신호전달 과정에 의존했다. *FGF9/16/20* antisense MO는 효과적으로 수압수용체세포 형성을 억제했고, FGF 수용체 억제제 SU5402 및 MEK 억제제 U0126도 발생 시기에 따라 특이적으로 작용했다. 또한, 실험으로부터 얻어진 유생들은 매우 유사한 표현형을 나타냈다(Fig. 1). 명계에서 *FGF9/16/20*는 신경유도세포에서 접합자 특이적으로 발현하는데 비하여(Imai et al., 2002; Kumano et al., 2006), FGF 수용체의 mRNA는 배아 전체에서 모계 발현이 관찰된다(Shimauchi et al., 2001; Davidson et al., 2006). 또한, 척추동물에는 4개의 FGF 수용체가 존재하는데 비하여 명계와 유령명계(*Ciona intestinalis*)에서는 FGF 수용체가 한 종류만 존재하는 것으로 추정된다. 따라서 SU5402 처리는 FGF 신호에 의하여 활성화되는 모든 신호전달 과정을 중간에서 억제할 것이다. SU5402 및 U0126의 특이성은 이전의 연구에서 입증되었다(Kim & Nishida, 2001; Hudson et al., 2003). 즉, 특정한 발생 단계에서 이들을 배아에 처리할 수 있어 FGF 신호전달 과정이 기능하는 시기를 정확하게 조사하는데 유용한 약물이다.

FGF 수용체 활성화는 16세포기부터 낭배기 이전까지 작용하는 것으로 수압수용체세포 형성을 충분히 유도했다(Fig. 2). 그러나, MEK 신호는 이보다 약 3시간 후인 신경관기 직전까지 요구되었다. 이와 유사한 현상은 안점과 평형기 색소세포 형성에서도 관찰되었다(Kim, 2003). 색소세포 형성에 있어서 FGF 수용체 활성화는 16세포기부터 초기 낭배기까지 요구되지만, MEK 활성화는 8세포기부터 초기 미충형 유생기까지 필수적이다. 이러한 결과는 다음과 같은 가능성을 시사한다. 첫째로, FGF 수용체에 의하여 활성화된 MEK/Erk 신호전달 과정이 신경관기까지 활성화 상태를 유지하며 수압수용체세포 형성을 조절하는 것이다. 다음으로 FGF 이외의 다른 신호전달 과정에 의한 MEK 활성화가 수압수용체세포 형성에 관여하는 것이다. 다만, 현재까지 명계에서 MEK 활성을 조절하는 FGF 이외의 신호(예를 들어 다른 RTK, receptor tyrosine kinase 신호 분자)에 대하여 보고된 것이 없다.

색소세포에 비하여 수압수용체세포 형성에서 FGF 신호전달 과정이 필요한 시기가 상대적으로 짧았다(Kim, 2003; present study). 즉, FGF 수용체 활성화는 1~2시간, MEK 활성화는 약 5시간 정도 짧게 요구되었다. 이는 색소세포가 수압

수용체세포에 비하여 멜라닌 분화 등을 포함하여 발생 과정에서 FGF 신호전달 과정을 더 오래 동안 요구하기 때문으로 추정된다. 색소세포 형성에서 BMP-chordin 길항작용은 미충형 유생기에 작용하여 안점과 평형기의 운명을 결정한다 (Darras & Nishida, 2001). 앞으로 FGF와 BMP-chordin 등의 신호전달 과정이 수압수용체세포 형성에 어떻게 상호 관련되는지 흥미 있는 연구주제로 사료된다.

이전 연구에서 유령명계 유생의 뇌포에 수압을 감지하는 세포로 추정되는 감각신경세포(수압수용체)가 존재한다고 보고되었다(Eakin & Kuda, 1971; Nicol & Meinertzhagen, 1991). 멍게에서도 유사한 형태의 세포를 발견하여 수압수용체세포로 명명하였다(Darras & Nishida, 2001; Kim et al., 2006). 유령명계에서 이 세포를 다른 연구자는 제2의 광수용체로 추정된다고 보고했다(Dilly, 1969). 또한, 형태적으로 볼 때 어류의 시상하부 밑부분에 존재하는 혈관주머니(saccus vasculosus)의 소관세포(coronet cell)와 유사하다는 보고도 있다(Katz, 1983; Moret et al., 2005). 어류의 소관세포는 구형의 섬모성 돌기를 뇌실 공동으로 내밀고 있으며, 많은 막성 관들을 돌기 내에 포함한다(Jansen & Flight, 1969). 현재, 멍게의 수압수용체세포 기능은 물론 어류의 혈관주머니와 소관세포 기능도 밝혀지지 않았다. 형태적인 유사성과 함께 어류의 소관세포와 멍게의 수압수용체세포에서 각각 시상하부 특이적인 glial fibrillary acidic protein과 dopamine 등의 발현이 검출되는 것에서 이들은 상동기관일 가능성이 있다(Moret et al., 2005; Sueiro et al., 2007). 앞으로 멍게류에서 수압수용체세포 기능 조사와 함께 수압수용체세포가 어류를 포함하여 척추동물의 진화에서 어떠한 기관으로 전환되었는지 흥미 있는 연구주제로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2003-003-C00119)에 의하여 연구되었음.

## 인용문헌

Bertrand V, Hudson C, Caillol D, Popovici C, Lemaire P (2003) Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal

- GATA and Ets transcription factors. *Cell* 115:615-627.
- Darras S, Nishida H (2001) The BMP/CHORDIN antagonism controls sensory pigment cell specification and differentiation in the ascidian embryo. *Dev Biol* 236:271-288.
- Davidson B, Shi W, Beh J, Christiaen L, Levine M (2006) FGF signaling delineates the cardiac progenitor field in the simple chordate, *Ciona intestinalis*. *Genes Dev* 20:2728-2738.
- Dilly PN (1969) Studies on the receptors in *Ciona intestinalis*. III. A second type of photoreceptor in the tadpole larva of *Ciona intestinalis*. *Z Zellforsch* 96:63-65.
- Eakin RM, Kuda A (1971) Ultrastructure of sensory receptors in ascidian tadpole. *Z Zellforsch* 112:287-312.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273:18623-18632.
- Hudson C, Lemaire P (2001) Induction of anterior neural fates in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Dev* 100:189-203.
- Hudson C, Darras S, Caillol D, Yasuo H, Lemaire PA (2003) Conserved role for the MEK signalling pathway in neural tissue specification and posteriorisation in the invertebrate chordate, the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* 130:147-159.
- 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.
- Jansen WF, Flight WFG (1969) Light- and electronmicroscopical observations on the saccus vasculosus of the rainbow trout. *Z Zellforsch* 100:439-465.
- Katz MJ (1983) Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. *Biol Bull* 164:1-27.
- Kim GJ (2003) Formation of sensory pigment cells requires

- fibroblast growth factor signaling during ascidian embryonic development. *Kor J Biol Sci* 7:221-225.
- Kim GJ, Nishida H (2001) Role of FGF and MEK signaling pathway in the ascidian embryo. *Dev Growth Differ* 43:521-533.
- Kim JE, Seo HJ, Kim GJ (2006) Brain vesicle structure and formation of the hydrostatic pressure receptors in larvae of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J Kor Fish Soc* 39:94-99.
- Kumano G, Yamaguchi S, Nishida H (2006) Overlapping expression of FoxA and Zic confers responsiveness to FGF signaling to specify notochord in ascidian embryos. *Dev Biol* 300:770-784.
- Miya T, Nishida H (2003) An Ets transcription factor, HrEts, is target of FGF signaling and involved in induction of notochord, mesenchyme, and brain in ascidian embryos. *Dev Biol* 261:25-38.
- Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276:955-960.
- Moret F, Christiaen L, Deyts C, Blin M, Joly JS, Vernier P (2005) The dopamine-synthesizing cells in the swimming larva of the tunicate *Ciona intestinalis* are located only in the hypothalamus-related domain of the sensory vesicle. *Eur J Neurosci* 21:3043-3055.
- Nicol D, Meinertzhagen IA (1991) Cell counts and maps in the larval central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.). *J Comp Neurol* 309:415-429.
- Satoh N (1994) *Developmental Biology of Ascidiaceans*. Cambridge University Press, New York, pp 36-131.
- 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.
- Sueiro C, Carrera I, Ferreiro S, Molist P, Adrio F, Anadón R, Rodríguez-Moldes I (2007) New insights on *Saccus vasculosus* evolution: a developmental and immunohistochemical study in elasmobranchs. *Brain Behav Evol* 70:187-204.
- Taniguchi K, Nishida H (2004) Tracing cell fate in brain formation during embryogenesis of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev Growth Differ* 46:163-180.

---

(received 21 October 2009, received in revised form 25 November 2009, accepted 26 November 2009)