

脊椎動物初期胚の胚発生における Matrix Metalloproteinaseの研究

神奈川大学総合理学研究所 茂木-豊泉和枝
神奈川大学理学部生物科学科 豊泉龍児
神奈川大学理学部生物科学科 小笠原強
神奈川大学理学部生物科学科 竹内重夫

研究成果の概要 (本研究の詳細に関しては『年報2003』研究論文で報告させていただきました)

細胞外基質は組織細胞が分泌する蛋白質によって構成されており、多細胞動物のからだは組織細胞と細胞外基質より形成されていると言える。胚においては、発生の進行に伴い組織の大規模な作り替えが間断なく行われ、これを組織のリモデリングと言う。組織のリモデリングは、両生類の変態や、成体の創傷治癒の際にも生じる。組織のリモデリングの際には、基底膜など既存の細胞外基質が蛋白質分解酵素によって一端分解され、その後、組織の再形成が進行する。ガン細胞は、増殖がコントロールされない異常を示す他に、その転移の際に、浸潤性 (invasiveness) と呼ばれる細胞外基質を分解し細胞移動する性質を有している。細胞外基質を分解する酵素としては、いくつかのファミリーが知られているが、その中でもMatrix Metalloproteinase (MMP; マトリクスメタロプロテアーゼ) は、その活性がガン細胞の転移能と緊密な相関を示すことから詳しく研究されている。MMPは、亜鉛要求性の金属プロテアーゼであり、ヒトをはじめとする哺乳類からは20種類以上のファミリーメンバーが同定されている。

かたちは小さいが劇的な形態形成が急速に進行する初期胚では、MMPはどのような役割を担うのであろうか? 我々は、両生類アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚を実験材料として、胚発生において最初の大規模な形態形成運動である原腸形成運動に、MMPが関与するか否かを検討している。従来の研究では、原腸形成期に数種類のMMPが発現することが、ウニ胚、ツメガエル胚、ニワトリ胚を中心に報告されてきたが、原腸形成や胚葉形成における特定のMMP酵素の役割について詳細に研究した例は殆どない。我々は、昨年、神奈川大学総合理学研究所の助成を得て、ニワトリの原条期胚 (カエルの原腸胚に相当する時期の胚) に、Stromelysin-3 (MMP-11) と呼ばれるMMPの一酵素が高レベルで発現していることを見いだした (2002年度総理研年報参照)。ニワトリ胚は、産み落とされた時期には既に数千個の胚細胞から構成されており、胚細胞の細胞質に遺伝子導入することでMMPの機能解析を行うことが難しい。そこで、今回は、既に全長がクローニングされているツメガエル胚の *stromelysin-3* のアンチセンス核酸を卵割期胚の細胞質に導入し、*stromelysin-3* の翻訳阻害を行うことがツメガエルの原腸形成にどのような影響を及ぼすのかについて調査した。

stromelysin-3 に相補的な配列を持ったMorpholino核酸（以下ST3 MO; ヌクレアーゼ耐性を強化した人工核酸）をアンチセンス実験に用いた。4細胞期の背側2割球もしくは腹側2割球にST3 MOを5ナノリットルずつ注射したところ、卵割期や桑実胚期には何ら変化は生じなかった。胞胚期になると一部の胚の細胞配列に乱れが生じ、細胞の接着性の異常が生じていることが伺えた。原腸胚期になると、0.05mM以上の濃度のST3 MOを注射した場合には、中胚葉内胚葉細胞になる予定細胞が陥入する領域である原口が、注射した側で形成されないケースが観察された。1-2mMのST3 MOの注射の場合には、原口形成領域を中心に、組織細胞間の接着性が著しく弱まり、その上皮構造が崩壊するケースが非常に高頻度で観察された。また、陥入運動の乱れに呼応して、原口付近には、圧潰死もしくは apoptosis（プログラム細胞死）を生じた細胞の破砕物（卵黄粒など）が流砂状にまき散らされた。これらの胚は、翌日の神経胚期には、背側2割球注射の場合には open blastopore（=原腸形成の進行が阻害された結果としての背側組織の閉鎖不全の表現型）を示すものが高頻度で観察され、腹側2割球注射の場合には 胴尾部の側面に卵黄栓（=原腸胚期にのみ一過的に形成され神経胚期には胚内に併呑されるはずの胚性構造物）を残したものが高頻度で観察された。

以上のように、ST3 MOによってStromelysin-3の働きのみを特異的にノックダウンした胚は原腸形成時に陥入不全を生じ、細胞接着の異常等も観察された。Stromelysin-3は、その基質となるfibronectinやlamininなどの分解を通じて、正常な原腸形成の進行に伴う細胞の再配列に必要な酵素であることが、今回の実験から強く示唆された。

Stromelysin-3は、両生類の幼生から成体への変態現象や、ガン組織のapoptosisに関与していることが知られている。また、カルシウム感受性接着分子であるcadherinの接着性の制御にも関係しているとの報告がある。我々の予想としては、*stromelysin-3* のノックダウンによって細胞陥入のみが抑制され、陥入すべき細胞が陥入出来ずに外に飛び出した外腸胚が得られると考えていた。しかしながら、意外なことに、原口付近の細胞接着が崩壊したことから、ツメガエル原腸胚におけるStromelysin-3は、細胞の周囲の細胞外基質を溶かして細胞を移動し易くする役割を負うばかりでなく、かなり広範な生理現象に影響を与えていることが示唆された。今後は、胚が非常に透明で胚細胞の振る舞いが観察しやすいゼブラフィッシュ胚の*Stromelysin-3* をクローニングし、硬骨魚類の胚発生におけるその役割を、機能抑制実験ならびに過剰発現実験の双方向から検討したい。

本研究に関連した塩基配列登録

ACCESSION AB114902 ; 403 bp mRNA linear VRT 19-JUL-2003
DEFINITION *Gallus gallus* MMP11 mRNA for stromelysin-3, partial cds.
AUTHORS Mogi, K., Ogasawara, T., Takeuchi, S. and Toyozumi, R.
TITLE The role of Matrix Metalloproteinases in chick gastrulation
(unpublished)