

神奈川県総合理学研究所2002年度共同研究報告書

## c ニワトリ胚の初期胚盤葉における細胞陥入運動の研究

### 研究組織

茂木-豊泉 和枝(総合理学研究所客員研究員)、豊泉龍児(生物科学科助手; 責任者)

### 【研究の背景と研究目的】

動物のからだは、単に細胞が寄り集まっただけのものではない。胚期のしかも早い時期から、組織細胞が細胞外基質と呼ばれる構造タンパク質を分泌することで、付着性細胞が寄り集まるための堅固な足場を構築し、その多細胞体制を維持するための支持組織としている。胚が成長し、大きくなっていくためには、この細胞外基質の足場を部分的に取り壊しながら、新たな足場を作り直す作業を絶え間なく行っている。この組織のリモデリングと呼ばれる動的な現象のうち、「壊す」方の役割は、細胞外で働くプロテアーゼが担う。中でもMatrix Metalloproteinase(MMP)と呼ばれる一群の亜鉛要求性プロテアーゼは、胚発生の後期から成体組織に至るまで、20種類以上のメンバーが様々な組織で活躍することがこれまでの研究から分かっている。即ち、MMPは大きなファミリーを形成し、癌細胞の転移、傷口修復、カエルの変態、リウマチ、受精後の哺乳類胚の胎盤組織への着床などのさまざまなシーンに必要な酵素群であることが分かっている。

脊椎動物の後期胚や成体におけるMMPの研究は、ヒトの癌に関連した研究を頂点として非常に活発に行われている。しかしながら、胚のサイズは小さいが細胞が激しく動き回り、劇的に相互の位置を入れ替える時期である原腸形成期(外胚葉・中胚葉・内胚葉の三つの胚葉が作られる時期)におけるMMPの役割は、未だにほとんど調べられていない。しかも、MMPの分解基質となる細胞外基質成分のタンパク質は、すでにこの時期よりも前の発生段階から先行して胚内に蓄積されることは10年以上も前から判明しているにもかかわらず、である。

棘皮動物のウニ胚や、両生類アフリカツメガエル胚では2-3種類のMMP遺伝子の転写が原腸胚で始まる、あるいは継続中であることが近年報告されたが、哺乳類のMMPが、上述の原腸形成という形態形成運動に関与するか否かについては、関与するという報告と関与しないという報告の双方が対立したまま決着がついていない。最近では、昆虫のモデル動物である*Drosophila melanogaster*の胚発生にMMPが全く関与しないという報告もある。

このような背景から、我々は、有羊膜類として哺乳類に近い発生様式を持ちながらも、子宮の中ではなく卵殻内で発生するために実験生物学的な操作が容易な鳥類ニワトリ胚を材料に、その原腸形成期\*にMMPの遺伝子発現が生じているか否かについて検討した。

\*.....ニワトリ胚では、原条形成期と呼ぶことが多い。

【主な成果】

MMPのアミノ酸配列は、いくつかのドメイン構造を有しており、相互に類似したアミノ酸モチーフを持つ領域がある。中でも、もっとも保存性の高いモチーフである、PRCG(V/N)PDとVA(A/V)HE(F/I/L)GHの2箇所の塩基配列のパターンを推定し、その degeneracyがある程度の数に収まるように設計したprimer群をもとに、degenerate PCR法によるニワトリ胚total RNAの増幅を行った(図1)。得られた増幅断片をpGEM-Tベクターにライゲーションし、これで大腸菌株JM109のトランスフォーメーションを行った。挿入配列(PCR産物)を含むプラスミドを持ったコロニーをカラーセレクションにより単離し、増殖させてプラスミドDNAを精製し、サイクルシーケンシング法により塩基配列を決定した。

図1 : degenerate PCRのprimerに用いた領域。各種MMP間で、最も保存された領域を用いた。primerのデザインはYang et al.(1997)に倣ったものを用いた。

|                     |     |                |  |     |   |     |                         |               |      |       |                 |     |
|---------------------|-----|----------------|--|-----|---|-----|-------------------------|---------------|------|-------|-----------------|-----|
| human MMP-2         | 84  | PQ-T-GDL       | DQNTIETMRK                               | --- | N | --- | ANY-NFFPR-KPK           | -----         | DKNQ | -IT   | 126             |     |
| mouse MMP-2         | 84  | PQ-T-GDL       | DQNTIETMRK                               | --- | N | --- | ANY-NFFPR-KPK           | -----         | DKNQ | -IT   | 126             |     |
| chick MMP-2         | 81  | PE-T-GDL       | DQNTIETMKK                               | --- | N | --- | ANY-NFFPR-KPK           | -----         | EKNH | -IT   | 123             |     |
| human MMP-9         | 81  | PE-T-GEL       | DSATLKAM-RT                              | --- | V | --- | GRFQT-FEGDL-K           | -----         | HHHN | -IT   | 123             |     |
| Xenopus MMP-9       | 80  | KE-T-GVL       | DAETLEAMKR                               | --- | V | --- | IGQFNT-FEGDL-K          | -----         | DHND | -IT   | 122             |     |
| chick MT3-MMP       | 83  | -N-MTG         | KVDRNTIDWMKK                             | --- | V | --- | GR-GSSKFNIR-R-KRYALTGQK | ---           | QHK  | -HIA  | 134             |     |
| chick CMMP          | 79  | -KV-TGK        | PDTELEMMKK                               | --- | V | --- | LYGVTLP---G             | -----         | K-KN | NLT   | 119             |     |
| human Stromelysin-2 | 73  | -EV-TGK        | LDTLEVM-RH                               | --- | V | --- | GHFS-SFPGMP-K           | -----         | R-KT | HLT   | 115             |     |
| mouse Stromelysin-3 | 66  | -VPA-S-HW      | VPSAGSSR                                 | --- | V | --- | PDVLNA-RN---            | RQKRFVLSGGRAE | ---  | KTDLT | 116             |     |
| human MMP-2         | 127 | RIIGYTPDLDPETV | -DDAFARAF-Q-VWSD                         | --- | R | --- | SRIHDGEA                | -----         | I    | MI    | NG-             | 174 |
| mouse MMP-2         | 127 | RIIGYTPDLDPETV | -DDAFARAF-K-VWSD                         | --- | R | --- | SRIHDGEA                | -----         | I    | MI    | NG-             | 174 |
| chick MMP-2         | 124 | RIIGYTPDLDPETV | -DDAFARAF-K-VWSD                         | --- | R | --- | NRIHDGEA                | -----         | I    | MI    | NG-             | 171 |
| human MMP-9         | 124 | WIQNYSEDL      | -PRAVIDDAFARAF-A-LWSA                    | --- | R | --- | TRVYSR-DA               | -----         | I    | VI    | NG-             | 171 |
| Xenopus MMP-9       | 123 | RILNYSPLDPE    | -VIDDAFARAF-K-VWSD                       | --- | R | --- | TRIY-SGEP               | -----         | I    | MI    | NG-             | 170 |
| chick MT3-MMP       | 135 | S-IKN          | VTPKVG-DA-ETRKATRRAFDWNQ                 | --- | R | --- | EEVPIELENGKR            | ---           | V    | DI    | TI              | 190 |
| chick CMMP          | 120 | RIVNYTPDLSKEVW | -DKAIQKA-FKARST                          | --- | R | --- | AR-IQ-EGIA              | ---           | I    | MI    | NG-             | 168 |
| human Stromelysin-2 | 116 | RIVNYTPDLPRDAV | -DSATEKA-LKWEE                           | --- | R | --- | SRLY--EGEA              | ---           | I    | MI    | NG-             | 164 |
| mouse Stromelysin-3 | 117 | RIL-RFP        | WQLVRE--QVRQTVAEALQVWSE                  | --- | R | --- | TEV-H--E--G-RAD         | ---           | I    | MI    | NG-             | 164 |
| human MMP-2         | 175 | RWE            | LDGY--P--FDG-KD-L                        | --- | L | --- | FAPGTGVGDS              | ---           | D    | LA    | TLGE-QQVVRVYK   | 225 |
| mouse MMP-2         | 175 | RWE            | LDGY--P--FDG-KD-L                        | --- | L | --- | FAPGTGVGDS              | ---           | D    | LA    | TLGE-QQVVRVYK   | 225 |
| chick MMP-2         | 172 | RWE            | LDGY--P--FDG-KD-L                        | --- | L | --- | FAPGGIGDS               | ---           | D    | LA    | TLGE-QQVVRVYK   | 222 |
| human MMP-9         | 172 | VAE            | LDGY--P--FDG-KD-L                        | --- | L | --- | FPPGGIGQDA              | ---           | D    | LA    | TLGE-QQVVRVYK   | 222 |
| Xenopus MMP-9       | 171 | TED            | LDGY--P--F-DRKD-L                        | --- | L | --- | YPPGGVQDA               | ---           | D    | LA    | TLGT-GT VVKT RF | 221 |
| chick MT3-MMP       | 191 | G-F            | D-SSPF--DGE-GF                           | --- | L | --- | YFPGGIG                 | ---           | D    | LA    | TLGNPNHD        | 236 |
| chick CMMP          | 169 | KA             | LDHCPR--YFDGP-L                          | --- | L | --- | FPPGSG-FGDV             | ---           | D    | LA    | TLGTMGSD        | 212 |
| human Stromelysin-2 | 165 | KE             | LDHCPR--YFDGP-L                          | --- | L | --- | FPPGSG-FGDV             | ---           | D    | LA    | TLGTMGSD        | 212 |
| mouse Stromelysin-3 | 165 | RYW            | LDHCPR--YFDGP-L                          | --- | L | --- | FPPGGLY                 | ---           | D    | LA    | TLGTMGSD        | 207 |
| human MMP-2         | 309 | -GRT           | DGYR-WCGTTEDYDRDKK-YFCPET-AMSTV          | --- | L | --- | GNSEGAPCVFPFTFLGNKYES   | ---           | I    | MI    | NG-             | 362 |
| mouse MMP-2         | 309 | -GRT           | DGYR-WCGTTEDYDRDKK-YFCPET-AMSTV          | --- | L | --- | GNSEGAPCVFPFTFLGNKYES   | ---           | I    | MI    | NG-             | 362 |
| chick MMP-2         | 306 | -GRT           | DGYR-WCGTTEDYDRDKK-YFCPET-AMSTV          | --- | L | --- | GNSEGAPCVFPFTFLGNKYDS   | ---           | I    | MI    | NG-             | 359 |
| human MMP-9         | 306 | -GRSD          | GYSR-WCATTANYDRDKL-FPCPTRADST-VM         | --- | L | --- | GNLALCVFPFTFLG-KEYS     | ---           | I    | MI    | NG-             | 359 |
| Xenopus MMP-9       | 305 | -GRQD          | GYSR-WCSTTANFDQDKK-YFCPNR-DTS-VI         | --- | L | --- | GNLALCVFPFTFLG-KIHN     | ---           | I    | MI    | NG-             | 357 |
| chick MT3-MMP       | 174 | ELENG          | KR-DVDITIIIFAS-G-FHND-SSPF--DGEF         | --- | L | --- | FLAHA--Y-F-P--PGGIG--   | ---           | I    | MI    | NG-             | 217 |
| chick CMMP          | 157 | EGIA           | ----D--IMVAFGT-KA-HHCPR--YFDGPL          | --- | L | --- | FLAHA--Y-F-P--PGSG-F-   | ---           | I    | MI    | NG-             | 195 |
| human Stromelysin-2 | 153 | EGEA           | ----D--IMISFAV-KE-HHCPR--DFYSFDG-PHSLAHA | --- | L | --- | FLAHA--Y-F-P--PGGGLY-   | ---           | I    | MI    | NG-             | 191 |
| mouse Stromelysin-3 | 154 | -E--G--RAD     | --IMIDFA--RYWHDNL-PF--DGGP               | --- | L | --- | FLAHA--Y-F-P--KTHRE--   | ---           | I    | MI    | NG-             | 192 |
| human MMP-2         | 363 | -CTSA          | LRSDGK-WCATTANYH-DDRKA--GFCPDQYS         | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 417 |
| mouse MMP-2         | 363 | -CTSA          | LRSDGK-WCATTANYH-DDRKA--GFCPDQYS         | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 417 |
| chick MMP-2         | 360 | -CTSA          | LRSDGK-LWCASTSSYH-DDRKA--GFCPDQYS        | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 414 |
| human MMP-9         | 360 | TCTSE          | LRSDGK-LWCASTSSYH-DDRKA--GFCPDQYS        | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 415 |
| Xenopus MMP-9       | 358 | SCTTD          | LRSDGK-LWCASTSSYH-DDRKA--GFCPDQYS        | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 413 |
| chick MT3-MMP       | 218 | -----          | DTH-----FSDP-PATLGNPNHD                  | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 260 |
| chick CMMP          | 196 | -----          | GVH-----FIDE-DITMGSD                     | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 236 |
| human Stromelysin-2 | 192 | -----          | DII-----FIDDE-KATEDAS                    | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 231 |
| mouse Stromelysin-3 | 193 | -----          | DVH-----FYDE-TITIGON-Q                   | --- | F | --- | ALFIMM                  | ---           | I    | MI    | NG-             | 233 |

決定した塩基配列の中には、相同性検索(BLAST search)の結果、両生類ツメガエルの *stromelysin-3*に相同性の高いクローン(図2)と、すでに既報のある、ニワトリMT3-MMPと相同性の高いクローン(図3)とが多数出現した。また、2例ながら、哺乳類のMT2-

MMPに相同性の高いクローンも得られた。ニワトリ *stromelysin-3* とニワトリ *MT2-MMP* に関しては、新規の部分塩基配列決定となる。今後、RACE法とよばれる方法で、*stromelysin-3*、*MT2-MMP* の翻訳領域全長の塩基配列決定を行う必要がある。

図2：最上段が、今回部分塩基配列決定に成功したchick *stromelysin-3* の推定アミノ酸配列。 *Xenopus stromelysin-3* との相同性はBLASTxで87%と非常に高かった。  
□はRXKRモチーフ(後述)。

|                       |     |   |     |
|-----------------------|-----|---|-----|
| chick ST3-partial     | 1   | -----GGEPDLVFLPQGQNGRRRQKRVLSSGGRWDKTDLTYKIIREFPAQLVSKVVRTI   | 54  |
| Xenopus ST3           | 1   | SWNPPRCGMPDITFAPPOSSTGRRRQKRVLSSGGRWDKTDLTYKIIREFPAQLVSKVVRTI | 60  |
| Ambystoma ST3-partial | 1   | ----PRGEMPDFAQPSQMGRRRQKRVLSSGGRWERTHLYKIIREFPAQLVSKVVRTI     | 56  |
| chick ST3-partial     | 55  | EEALKWWSDEMTPLTFTVEQEGRAOTVDFTRVWHGONLRFDDGGGILAHAFPPKTHREGD  | 114 |
| Xenopus ST3           | 61  | AEALKWWSDEMTPLTFTVEHGGRSQITVDFTRVWHGONLRFDDGGGILAHAFPPKTHREGD | 120 |
| Ambystoma ST3-partial | 57  | AEALQWWSDEMTSLTFTVESGGRADITVDFTRVWHGONLRFDDGGGILAHAFPPKTHREGD | 116 |
| chick ST3-partial     | 115 | VHFDYDETWTIGNNLGTDLLQVAAH-----                                | 139 |
| Xenopus ST3           | 121 | VHFDYDEAWTIGNNIGTDLLQVAAEHFGHM                                | 150 |
| Ambystoma ST3-partial | 117 | AHSMTR-----   | 123 |

図3：下段が、今回部分塩基配列決定に成功したchick *MT3-MMP* の推定アミノ酸配列。既知の登録配列(GenBank No. U66463)とは1アミノ酸残基分違っていた。材料としたニワトリ種の違いが原因かもしれない。□はRXKRモチーフ(後述)。

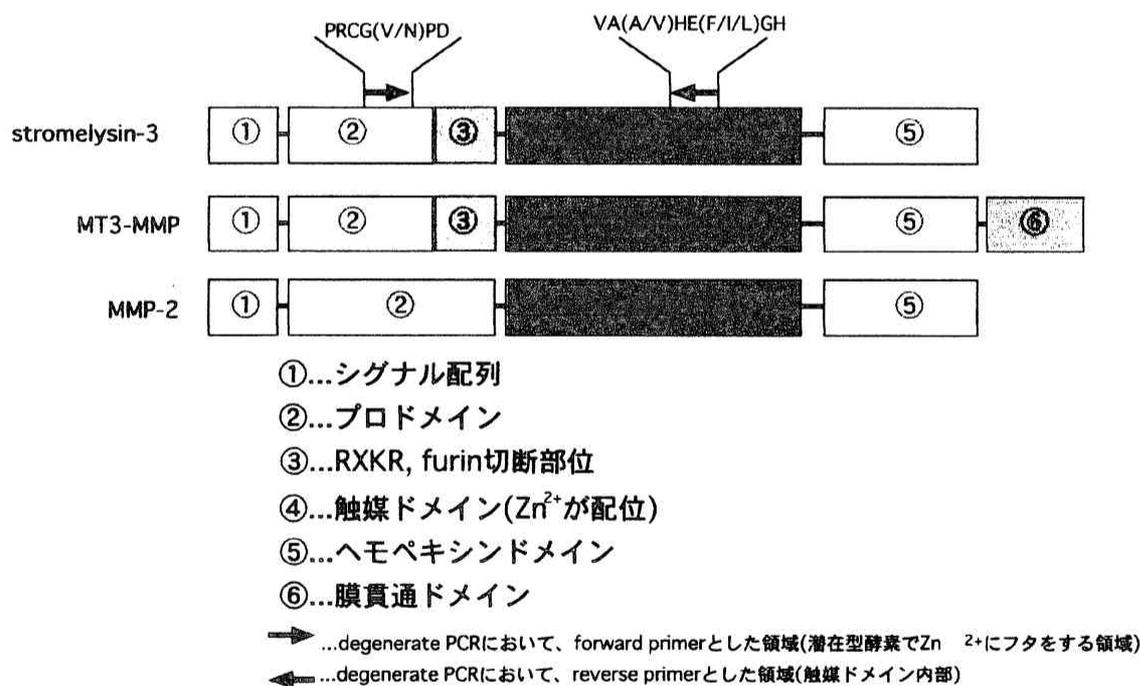
|                            |     |  |     |
|----------------------------|-----|--|-----|
| chick MT3-MMP comp cds.pep | 1   | MIVLALSTGSRDLDFVVSQSRVLFLLQTCVWILCATVCKAEQYFNVEVWMLQKYGYLPPTDPRM | 60  |
| cmmp-partial               | 1   | -----  | 1   |
| chick MT3-MMP comp cds.pep | 61  | SVLPSAETMQSAIAANQQFYGINMTGKVDPNITDWMCKPRCGVFDQTRGSSKENVRAKRR     | 120 |
| cmmp-partial               | 1   | -----FDQTRGSSKENVRAKRR   | 17  |
| chick MT3-MMP comp cds.pep | 121 | DLTGOQWQHHLIAYSTINVTPIVGDAAETRAAIRRAFDVAQNVTLTFEEVRYILENGYR      | 180 |
| cmmp-partial               | 18  | DLTGOQWQHHLITYSINVTPIVGDAAETRAAIRRAFDVAQNVTLTFEEVRYILENGYR       | 77  |
| chick MT3-MMP comp cds.pep | 181 | DVDITLIFASGFHGDSPPFDGEGGFLAHANFPGPGIGGDTDFDSDPEPMTLGMPNHDGNDL    | 240 |
| cmmp-partial               | 78  | DVDITLIFASGFHGDSPPFDGEGGFLAHANFPGPGIGGDTDFDSDPEPMTLGMPNHDGNDL    | 137 |
| chick MT3-MMP comp cds.pep | 241 | RLVAVHELGHALGLEHSNDPTAIMAPFYQYMETDNFKLPNDLQGIQKIYGPDPRI PPPT     | 300 |
| cmmp-partial               | 138 | RLVAV-----   | 141 |

【考察】

ツメガエル *Stromelysin-3* は、幼生から成体への変態の際の尾の短縮や消化管組織のリモデリングに働く酵素であることが知られている。細胞外基質のうち、lamininやfibronectinを基質とする。ニワトリ胚の原腸形成においても、これらlamininやfibronectinが細胞の足場となる細胞外基質として必須の役割を担うことが、様々な実験から示されている。これらの報告からすると、ニワトリ *Stromelysin-3* がニワトリ胚の胚葉形成運動に重要な役割を担うことが期待されるので、今後、アンチセンス核酸法などを用いてこの機能解析実験を行いたい。 *MT3-MMP*、*MT2-MMP* は、細胞膜貫通領域を持つMMPである。これらに関しては、従来は、MMPファミリーの他のメンバーを活性化型に変換する働きのみを持つものと見なされてきた。最近では、それに加えて、細胞膜に

アンカーされた状態で、MT-MMP自身も細胞外基質を直接分解する活性を有するとの報告が相次いでいる。ニワトリMT-MMPが原腸形成運動の際に、どちらの役割を担うのか、それとも成体組織における報告同様に、両方の働きを担うのかについて、今後生化学的な解析を行う必要がある。いずれにせよ、サイズが小さく細胞数も成体ほど多くはないニワトリ原腸胚の中で、膜アンカー型のMT-MMPが、細胞陥入の起こる局所の場面で繊細な近接作用を働かせていることが期待される。

胚葉形成期のニワトリ胚から二つのMMP遺伝子が検出されたが、この2つの共通項は何であるか？MMPは活性を有するまでに、多段階の活性化機構によって、厳密に活性発現が制御され、MMPの異常な高発現により組織が破壊されるのを防ぐ仕組みになっている。Stromelysin-3とMT-MMPは、prohormone convertase(PC family; furinなど)の仲間によって、プロドメイン部分のRXKR配列が認識されその近傍で切断されることで活性化され、活性型として細胞外に分泌されるタイプのMMPである。他のMMPはRXKR認識配列を持たず、潜在型として分泌された後に、MT-MMPなどによって細胞外で部分分解を受け、その後自己触媒反応が生じて活性化される。興味深いことに、Stromelysinの仲間は現時点で3つが同定されているが、Stromelysin-3のみがRXKR配列を持つ。



ニワトリの初期胚細胞は、数が少なく、巨大な端黄卵の表層のごく一部の領域に存在するため卵黄から単離する作業が難しく、一度に多くのRNA, タンパク質を得ることが困難である。そこで、ニワトリMMPの遺伝子の全長を含むクローンを得た後に機能解析を行うにあたっては、胚が一度に大量に得られ細胞質へのmRNAの注射実験(遺伝子の発現実験)の行いやすい等黄卵のツメガエル卵を材料にすることを考えている。ニワトリ胚ならびにツメガエル胚の原腸形成におけるStromelysin-3などのMMPの役割について、ふたつの脊椎動物胚の長所を生かし短所を回避しつつ、その共通性と相違点を探る機能解析を進めていこうと考えている。//