

アフリカツメガエル胚の原腸形成には Stromelysin-3 (MMP-11) が必要である

神奈川大学総合理学研究所客員研究員 茂木和枝
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
神奈川大学理学部生物科学科 豊泉龍児

1. 序論

Matrix Metalloproteinase (MMP; マトリクスメタロプロテアーゼ) は、亜鉛要求性の金属プロテアーゼであり、哺乳類を中心に各綱の脊椎動物から20種類以上のファミリー分子が単離され機能解析されている。MMPはプロ型(不活性型)として細胞外に分泌された後に自己触媒反応や、Furinなどの他のプロテアーゼによる部分分解を受けて活性型に変換された後に、collagenやlaminin, fibronectinなどの細胞外基質の構成蛋白質を分解する(清木と佐藤, 1992; 宮崎と東, 1996; McCawley and Matrisian, 2001)。その生理作用は、ヒトをはじめとする哺乳類の成体を中心に研究が進められ、癌細胞の転移の際にみられる原発巣からの離脱や他臓器への浸潤、関節リウマチ、歯肉炎、腫瘍の血管新生などの病態に深く関与することが知られている(Westermarck and Kahari, 1999; Ray and Stetler-Stevenson, 1994)。また、胎児組織の胎盤への着床、皮膚創傷の治癒や両生類(カエルやサンショウウオの仲間)の変態などの生理過程においても、組織のリモデリングを行う中心的な酵素として働くことが知られている(Shi, 1995; Alexander et al., 1996; Schatz et al., 1999; Ravanti and Kahari, 2000; Jung et al., 2002)。

劇的な形態形成が急速に進行する初期胚の中には、胞胚期以降、MMPの基質となる細胞外基質が、形態形成を行う胚細胞の足場として豊富に存在する。では、初期胚においてMMPはどのような役割を担うのであろうか? この単純かつ魅力的な問題に関しては、今日まで実は余り研究されておらず、両生類ツメガエル胚で、4種類のMMPが胚葉形成期である原腸胚期に発現すること(Yang et al., 1997)や、ニワトリの体節期胚の神経堤細胞の遊走時や心臓形成において一部のMMP (gelatinaseの仲間)が一過的に働くこと(Alexander et al., 1997; Cai et al., 2000; Cai et al., 2002; Duong and Erickson, 2004)などが、散発的に報告されているのみである。ここ数年の間によく、各モデル動物の胚発生において、どの種類のMMPがどの発生段階で発現するのか、というレベルの研究が開始されつつある状態である。ヒトの成体組織におけるMMPの役割については多くの知見が蓄積されているが、脊椎動物初期胚の形態形成におけるMMPの関与については、不明な点が多いと言える。

今回我々は、両生類胚における最初の大規模な形態形成運動である原腸形成運動において、ガン細胞の浸潤や変態期の組織のリモデリングにおいて中心的に働くStromelysin-3 (MMP-11)が関与するか否かについてアンチセンス核酸法を用いて調査した。実験材料としては、典型的なモデル脊椎動物である両生類ツメガエル胚を用いた。原腸胚期に先立つ胞胚期には、その胞胚腔を裏打ちする形で、急激な細胞外基質の合成と蓄積がある (Lee et al., 1984; Darribere et al., 1986; Nagel and Winklbauer, 1999)。その中でもfibronectinとlamininは、細胞運動の足場として不可欠な細胞外基質構成蛋白質である (Nakatsuji, 1986; Danker et al., 1993; Boucaut et al., 1996; Ramos and DeSimone, 1996; Winklbauer and Keller, 1996)。fibronectinやlamininを分解するMMPとして、Stromelysin-3が知られている (Murphy et al., 1993; Noel et al., 1995)。Stromelysin-3は分子量55 kDa (活性型では27kDa)で、ヒトの腫瘍組織や間葉系細胞に高発現し、腫瘍細胞の悪性化を促進するMMPとして発見された (Basset et al., 1990; Basset et al., 1993; Rio et al., 1996; Basset et al., 1997)。stromelysin-3遺伝子は、アフリカツメガエル胚からはPattertonらによって1995年にクローニングされ、そのORFは477アミノ酸からなる。ツメガエル胚では、stage 10/11の初期原腸胚期ないし中期原腸胚期から発現が開始され、孵化期 (stage 33/34)と変態期 (stage 60)に最も転写量が多い (Patterton et al., 1995; Damjanovski et al., 2000)。そのため、変態期の組織のリモデリングに関与するのではないかとの観点から詳しい研究がなされている。尾芽胚期には鰓弓や尾芽の一部に発現する。また変態期には、小腸や退縮する尾の間葉系細胞に発現し、その発現は変態ホルモンである甲状腺ホルモン依存的である (Patterton et al., 1995; Ishizuya-Oka et al., 1996; Damjanovski et al., 1999; Ishizuya-Oka et al., 2000)。様々な発生段階におけるstromelysin-3の組織特異的な発現パターンについては、マウス胚で詳しく解析されている (Lefebvre et al., 1995)。着床した胚の栄養芽細胞層や、マウス原条胚 (カエルの原腸胚に相当する)の胚体、器官形成期には脊髄神経、鼻、肢芽、尾、骨などに高発現することが知られている。筆者らは、ニワトリ原条期胚 (原腸胚)の細胞陥入領域である原条からstromelysin-3 mRNAを検出し、これの一部をクローニングした (茂木ら, 2002)。このことから、脊椎動物の原腸胚においてStromelysin-3が一定の役割を担っていることが期待された。脊椎動物胚の中でも、ツメガエル胚は体外受精で発生が進み、卵割球が大きく、細胞質にアンチセンス核酸を導入してloss-of-function実験を行うのが容易である。そこで、ツメガエルのstromelysin-3に対するアンチセンスMorpholino oligonucleotideを卵割期胚の細胞質に導入し、原腸形成運動に及ぼす影響を調査した。

2. 実験方法

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)の成体雄に200 unit, 成体雌に600 unitの生殖腺刺激ホルモンを注射し、飼育水を満たしたケージで交配させて有精卵を得た。2.5%チオグリコール酸溶液 (pH8.6)によって脱ゼリーした卵割期胚を、10%Steinberg溶液で洗浄後、

(微量注射の際に胚の滑り止めとなる)テラサキプレート上に並べた。*Xenopus stromelysin-3*遺伝子(GenBank ID; Z27093)の転写開始点下流で翻訳開始コドンよりもすぐ上流の塩基配列に相補的な配列である5'-CAA GCT GTA GGG TGA GTG TGA TAC-3'を配列にもつ、antisense Morpholino oligonucleotide (以下、これをST3 MOと略す)を超純水に0.01-2mMの濃度で溶かし、これを4細胞期胚の背側2割球もしくは腹側2割球に5nl (nanoliter)ずつ合計10nl注射した。また、上記のアンチセンスMOが、*Xenopus stromelysin-3*遺伝子の配列を認識して作用していることをチェックするために、即ち、誘起された現象がMOの化学的な性質に依存したものではないことを確認するために、ヒトglobin遺伝子mRNAに相補的な5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'の配列のMorpholino oligo.を2mMの濃度で4細胞期胚の背側2割球もしくは腹側2割球に5nlずつ注射することで、コントロール実験を行った(以下、これをcontrol MOと略す)。注射はDrummond社製微量注入器の“Nano-ject”で行った。注射後の胚を、4%Ficoll(分子量40万)を溶かした10%Steinberg溶液を満たした6穴プレートもしくは24穴プレートの中に無菌的に静置し、主に18°Cで翌日に同腹無処理胚がstage 18-26に達するまで培養し、生存率や表現型を記録した。胚の一部は、同腹無処理胚が胞胚期から原腸胚期にかけての時期と、後期神経胚期から初期尾芽胚期にかけての時期にオリンパス製実体顕微鏡SZX-12に装着したデジタルカメラ(DP-12)で写真撮影を行った。1日培養後にFicollを含まない10%Steinberg溶液に注射胚を移し飼育を続けた。

3. 実験結果と考察

0.01-2mMの濃度のST3 MOを、4細胞期の背側2割球に、それぞれ5nlずつ注射した。注射胚は、卵割期から桑実胚期にかけては、濃度にかかわらず、同時に培養した同腹胚と差異無く正常に発生した。胞胚期には、1-2mMのST3 MO注射胚の一部で、注射側の割球由来の背側細胞の卵割が遅れる傾向が観察された。原腸胚期になると、0.05mM以上の濃度の場合には、原口背唇部から形成されるべき細胞陥入領域が形成されない胚がしばしば観察された(図A)。1-2mMの濃度のST3 MOを注射した場合には、濃度依存的に、過半数ないしほぼ全例において、注射した側の原口領域の細胞の上皮構造が緩んで崩壊した。このような細胞間接着の崩壊は、卵黄栓の注射した側の表面にまで及んでいることもあった(図B)。原口領域で接着性を失った細胞が、卵膜(chorion)と胚の間に挟まれて、擦りつぶれた状態も多く観察された。0.1-2mMのST3 MO投与胚の大半では、原腸形成の開始とともに大半の胚の原口付近が崩壊に呼応して死に始めたが、翌日まで生き残った胚は、無傷のanimal cap(動物局半球)細胞が崩壊した植物局側細胞を吐き出して小さく丸まり、上皮の被覆性を回復して生存を続け、2日後には水疱状の組織塊となった(図D)。

正常胚では、神経管期になると神経管の閉鎖が神経溝の全長にわたって生じ、次いで、脊索の伸長を起因として胚の外形が急激に縦長に伸びる。しかしながら、0.01-0.1mMの低濃度のST3 MOを4細胞期の背側2割球に注射した胚では、卵黄栓が神経胚期後期になっても

背側に残り、神経管が閉鎖不全を起こし、双尾、短軀を特徴とした、open blastoporeと呼ばれる表現型が頻出した(図C; 表1)。0.05mMの濃度のST3 M0を注射した場合には、43例注射し、26例生存した中で16例がopen blastoporeとなり、残りは正常な単尾の胚となった。0.01mMの濃度のST3 M0を背側に注射した場合には、神経管の閉鎖不全は、胚の後方のみ観察された(図E)。0.02mMの濃度のST3 M0を腹側に注射した場合には、未分化な植物極細胞が胚の後方の側面に残存し、背側に注射した場合と同じく原腸形成運動が妨げられたことが分かった(図F)。

open blastoporeは、一般に、背側の形成不全や原口における細胞の巻き込み運動(involution)が不完全な場合に生じる。ST3 M0注射によりStromelysin-3の基底膜溶解酵素としての作用が原口の周囲で阻害された結果、細胞陥入が妨げられたと考えられる。言い換えれば、原口における細胞の陥入運動にStromelysin-3が必要であることを本研究は示している。今後、組織切片を作成して、細胞陥入領域の周囲の組織構築の変化を詳細に調べる必要がある。

ST3 M0が原腸形成運動を妨げたばかりか、高濃度では注射した側の植物極側組織の崩壊まで誘起するに至った原因としては、以下の3つの仮説が考え得る。

(1) ST3 M0の効果によって原腸胚表層の細胞間接着が弱まり、陥入する細胞層が原腸形成運動の張力に耐えきれずに崩壊した。(2) ST3 M0の効果により、apoptosis経路が誘導された。(3) ST3 M0はconvergent extension(原口めがけての大規模な細胞移動)には影響せず、原口形成予定領域めがけて細胞が押し寄せたが、陥入運動がST3 M0によって妨げられたので、その圧力で細胞が圧死し細胞層の崩壊を誘起した。

このうち、(1)に関しては、StromelysinやMatrilysin(MMP-7)が上皮に発現する接着分子E-cadherinの細胞外領域の切断を介して、ガン細胞の細胞浸潤(invasion)を正に制御することが知られている(Noe et al., 2001)。ツメガエル胚のE-cadherinは、原腸形成期に陥入運動する細胞層において、その上皮性の維持に必要であることが示されている(Levine et al., 1994)。また、Xcadherin-11など他のcadherin分子群も、原腸形成期にはシグナル分子の影響下で複雑な発現の消長を繰り返すことが明らかにされている(Hadeball et al., 1998; Montero and Heisenberg, 2003)。原口領域におけるST3依存的な接着分子の切り替えがST3 M0によって妨げられたのかも知れない。(2)に関しては、一部の腫瘍細胞ではStromelysin-3が、そのapoptosisを未知の経路で抑制する作用があることが最近2つのグループから独立に報告された(Boulay et al., 2001; Wu et al., 2001)。ST3 M0の効果によって、Stromelysin-3依存的な細胞生存機構が破綻し、apoptosisが生じた可能性がある。Stromelysin-3は、胚形成のプロセスにおいて、apoptosisを生じる領域の近傍に高発現することが知られている。ツメガエル胚の幼生型から成体型への小腸上皮細胞の変換に伴い幼生型細胞はapoptosisによって取り除かれるが、変態期には直下の間葉系の細胞にStromelysin-3が高発現する(Patterton et al., 1995; Ishizuya-Oka et al., 2000)。マウス胚発生においても、apoptosisを生じる上皮組織の直下の間葉細胞にstromelysin-3が

強い発現をすることも知られている(Lefebvre et al., 1995; Dupe et al., 1999)。これらの観察結果から、Stromelysin-3が誘起する基底膜組織の再構築がapoptosisを誘導するという予想を抱きがちであるが、上記のBoulayら(2001)やWuら(2001)の示した知見からすると、原腸形成中の組織においては、Stromelysin-3がapoptosisの過剰な進行を負に制御している可能性も考えられる。ツメガエル原腸胚において、一部の細胞が胚発生において最初のapoptosisを生じるが(Hensey and Gautier, 1998)、脊椎動物胚の原腸形成にapoptosisが必要であるか否かも含めて、その生理的な意味については、まだ未解明な部分が多い。今後は、ST3 MO注射胚において、apoptosisを生じる細胞量に変化があるのかを調べる必要がある。(3)については、一部の胚で、細胞死は認められないが、注射した側の原口の形成が全く生じていない現象が観察されたことや、1-2mMの高濃度のST3 MOの注射を行った場合には、卵黄栓から細胞が外側にむけて噴出する異常が見られたことから、考え至った可能性である。ST3 MO注射を行った胚の組織片や胚細胞を単離して、その運動を解析することで手がかりが得られるかもしれない。

今回の結果は、脊椎動物胚の原腸形成運動に、MMPのメンバーが必要であることを示した最初の実験結果である。ST3 MOの効果には予想外のものも含まれていたもので、今後の解析は多岐にわたる実験手法から行わねばならない。今回用いたST3 MOは、*Xenopus stromelysin-3*の翻訳開始点の直ぐ上流のnon-coding regionに相補的な配列であるので、他のMMP遺伝子に相同性が極めて低い領域であり、ST3 MOが他のMMP mRNAにcross hybridizationしていることはないと考えている。*stromelysin-3*のノックアウトマウスは既に作出されており、腫瘍を作りにくい体質を有する他は異常な表現型を示すことはなく、ほとんど正常なまま出生する(Masson et al., 1998; Lijnen et al., 1999)。しかしながら、Morpholino oligonucleotideを用いたツメガエル*stromelysin-3*のノックダウン実験からは、原腸形成時におけるシビアな異常が観察された。哺乳類の場合には、20種類を超えるMMPのファミリーメンバーが知られており、いずれのMMPのノックアウト胚においても、それほどシビアな表現型は得られていない(Parks and Shapiro, 2001)。MMP間の基質の分解特性や発現パターンの重複が、単一のMMP遺伝子のノックアウトの表現型を出にくいものにしていて考えられている。一方ツメガエル胚からは、未だ数種類のMMPしか同定されておらず、原腸胚期に発現するMMPとしては、*gelatinase-B*(MMP-9)、*stromelysin-1*、*stromelysin-3*(MMP-11)、*XMMP*(MMP-21)の4つが知られるのみである(Yang et al., 1997; Carinato(2000)らは原腸胚からは*gelatinase-B*が検出されないと報告している)。このうち、原腸形成運動に非常に重要な細胞外基質であることが証明されているlamininやfibronectinを主な分解基質とするのはStromelysin-3であり、Gelatinase-Bは主にcollagenを分解する(McCawley and Matrisian, 2001)。XMMPについては、哺乳類胚の肝臓やガン組織にも相同遺伝子が存在することが最近判明したが、基質特異性は未だ未解明である。ツメガエル胚の原腸形成期には、MMPsの機能的重複性(redundancy)が『手薄』であり、原腸形成運動において、Stromelysin-3は主要なキーエンザイムであることが、今回

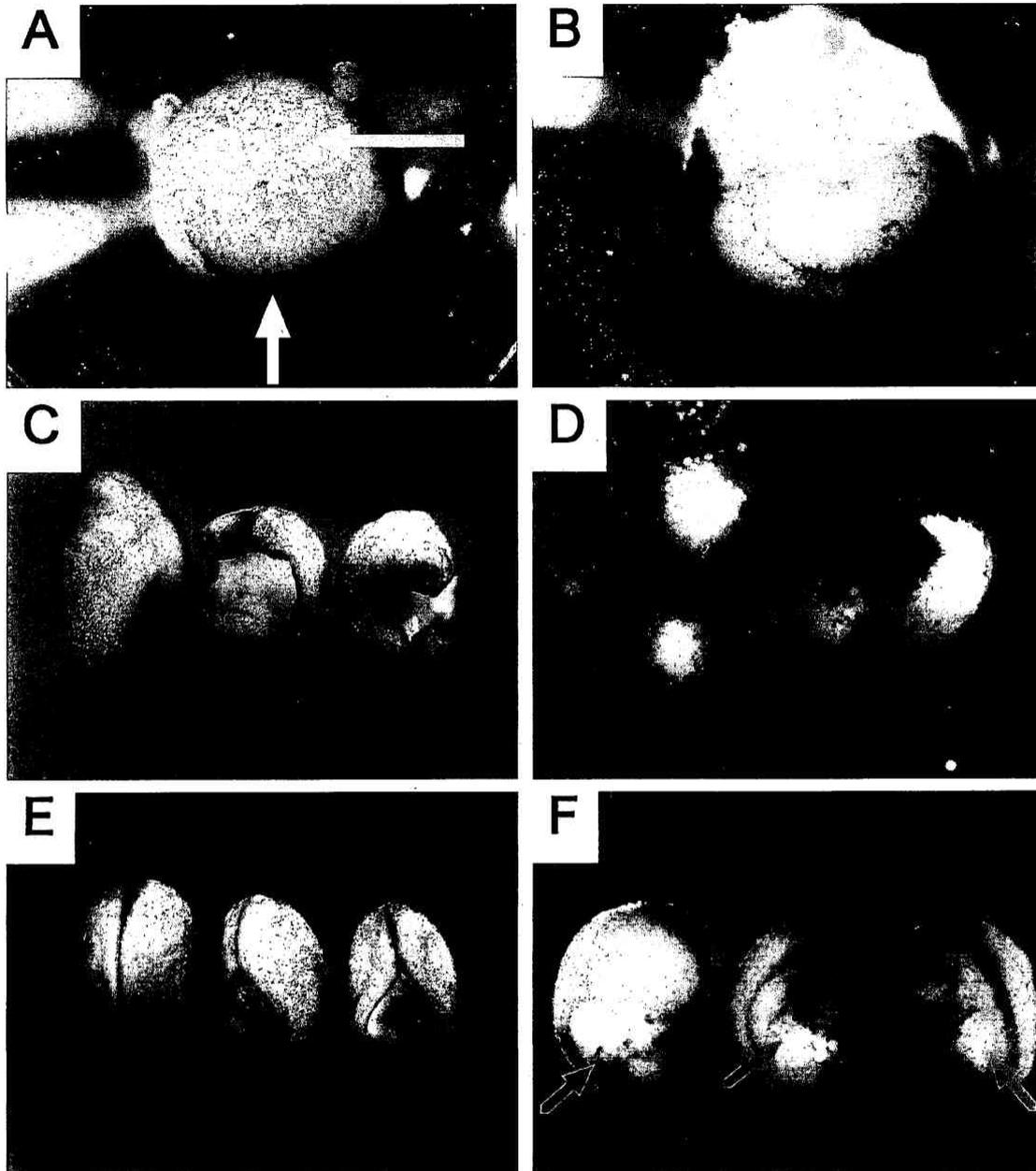
のMorpholino実験から示唆された。筆者らの経験からしても、他の研究グループの報告をみても、通常Morpholino oligoは、1mM前後で有効な作用を示すが(Summerton and Weller, 1997)、今回の結果では0.01-0.02mMときわめて低い濃度でも、大きな効果を示した。原腸胚期におけるMMPの発現は非常に低く、哺乳類では原腸胚におけるMMP発現の有無に関しては論争がある。ツメガエルの*stromelysin-3*に関して、以前の論文では、原腸胚期に発現なしとしたものもあり、非常に発現量が低い(Damjanovski et al., 2000)。これは細胞外基質溶解酵素としての、重要であり且つ危険な活性故のことであると予想される。比較的low濃度のMOを用いたにもかかわらず、大きな効果をもたらしたのは、*Xenopus stromelysin-3*の発現量が低いからであると考えられる。

4. 今後の展望

今後は、ツメガエル原腸胚期に発現する他のMMPである *gelatinase-B* や *XMMP* の Morpholino oligonucleotide による機能阻害実験を行い、これらのMMPの原腸形成運動に対する関与の有無を調べ、関与する場合には、Stromelysin-3との機能的な役割分担についても調べたい。更に、degenerate primerを用いたRT-PCR法により、ツメガエル原腸形成時において発現するMMPメンバーをスクリーニングする予定である。また、*stromelysin-3* の *in situ hybridization* や Stromelysin-3 認識抗体を用いた免疫染色を行い、そのmRNAと蛋白質の原腸胚期における分布パターンも調べる必要がある。*XMMP* に相同なイモリ胚の遺伝子である *CyMMP* に関しては、中胚葉誘導分子である *activin* によって *animal cap* に誘導されることが報告されている(Suzuki et al., 2001)。ラットや *Xenopus* の *ST3* の転写調節領域にはGAGA binding domainがあり、ツメガエル *stromelysin-3* 遺伝子の promoter 領域の構造は哺乳類のそれと類似性が高いが、他のMMPの転写調節領域とは大きく異なっていることが報告されている(Li et al., 1998)。どのような誘導シグナルが Stromelysin-3 の発現誘導を行っているのか、また *stromelysin-3* 遺伝子が他のMMPよりも早く分岐し進化的に古いと言えるのかについても興味深い問題である。

5. 謝辞

本研究は、神奈川大学総合理学研究所2003年度共同研究『脊椎動物初期胚の胚発生におけるMatrix Metalloproteinaseの研究』の一環として行われました。また、研究の一部は、神奈川大学ハイテクリサーチセンター『高度機能を持つ分子・生物ホトニクス基盤技術開発』によって導入された機器を用いて行いました。御礼申し上げます。



図版解説: *Xenopus stromelysin-3*に相補的なMorpholino oligonucleotide(ST3 MO)を注射し、*stromelysin-3*のノックダウンを行ったアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)胚。A, Bでは12時方向が背側で植物局側から撮影。C, E, Fにおいては12時方向が頭側で主に背側から撮影。
 (A) 1mMのST3 MOを背側2割球に5nlずつ注射した胚。背側組織の細胞陥入領域である原口背唇の形成が見られない(緑矢印)。原口腹唇は形成されている(白矢印)。(B) 1mMのST3 MOを背側2割球に5nlずつ注射した胚。この胚では原口背側と卵黄栓の背側で上皮層の崩壊が生じている。(C) 0.1mMのST3 MOを背側2割球に5nlずつ注射した胚。同腹無処理胚(左側の1匹)が初期尾芽胚期(stage 24)に達するまで培養した。背側に卵黄栓が残り、神経管の閉鎖不全と短軀を特徴とするopen blastoporeの表現型が高頻度で観察された(中央と右側の2匹)。(D) 2mMのST3 MOを背側2割球に5nlずつ注射した胚。左側の2胚は卵黄膜を剥いて撮影した。植物極側組織が崩壊し、動物局側の組織がこれを吐き出して収縮している。1-2日の培養後、このようなケースは死滅するか、水疱化した。(E) 0.01mMのST3 MOを背側2割球に5nlずつ注射した胚。同腹無処理胚(左側の1匹)が後期神経胚期(stage 19)になるまで培養した。背側後方が閉鎖不全を起こし、卵黄栓が残っている。(F) 0.02mMのST3 MOを腹側の2割球に5nlずつ注射した後に1晩培養した胚。同腹胚が後期神経胚に達した段階で撮影した。腹側の原腸形成運動が阻害され、胚の後方(6時方向)の側面に未分化な植物極細胞が残っている(矢印)。

4細胞期胚へのstromelysin-3 MO injection

培養翌日に生存率を計算した。

濃度(mM)	0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	1	2
背側2割球	100 44/44	100 31/31	100 42/42	60 26/43	30 27/90	23 11/48	48 33/69	29 21/72
腹側2割球	95 40/42	- -	88 21/24	20 5/25	- -	- -	26 8/31	- -

上段: 生存率(%)

下段: 生存胚数/実験胚数

4細胞期胚へのcontrol MO (human globin MO) injection

培養翌日に生存率を計算した。

濃度(mM)	2
背側2割球	98 61/62
腹側2割球	100 62/62

上段: 生存率(%)

下段: 生存胚数/実験胚数

培養翌日における生存胚の内訳 (stromelysin-3 MO, 背側2割球注射)

濃度(mM)	正常胚	Open Blastpore	水泡奇形	その他奇形
0	98% (n=43/44)	2% (n=1/44)	0% (n=0/44)	0% (n=0/44)
0.01	74% (n=23/31)	19% (n=6/31)	6% (n=2/31)	0% (n=0/31)
0.02	90% (n=38/42)	10% (n=4/42)	0% (n=0/42)	0% (n=0/42)
0.05	16% (n=7/43)	37% (n=16/43)	7% (n=3/43)	0% (n=0/43)
0.1	4% (n=4/90)	10% (n=9/90)	13% (n=12/90)	2% (n=2/90)
0.5	10% (n=5/48)	0% (n=0/48)	10% (n=5/48)	2% (n=1/48)
1	0% (n=0/69)	0% (n=0/69)	48% (n=33/69)	0% (n=0/69)
2	0% (n=0/72)	0% (n=0/72)	29% (n=21/72)	0% (n=0/72)

培養翌日における生存胚の内訳 (stromelysin-3 MO, 腹側2割球注射)

濃度(mM)	正常胚	Open Blastpore	水泡奇形	その他奇形
0	95% (n=40/42)	0% (n=0/42)	0% (n=0/42)	0% (n=0/42)
0.02	63% (n=15/24)	21% (n=5/24)	4% (n=1/24)	0% (n=0/24)
0.05	8% (n=2/25)	4% (n=1/25)	0% (n=0/25)	8% (n=2/25)
1	0% (n=0/31)	0% (n=0/31)	26% (n=8/31)	0% (n=0/31)

培養翌日における生存胚の内訳 (control MO, 2mM 注射)

注射位置	正常胚	Open Blastpore	水泡奇形	その他奇形
背側2割球	95% (n=59/62)	3% (n=2/62)	0% (n=0/62)	0% (n=0/62)
腹側2割球	98% (n=61/62)	2% (n=1/62)	0% (n=0/62)	0% (n=0/62)

6. 引用文献

清木 元治、佐藤 博(1992).

『マトリックスメタロプロテイナーゼと転移能』
細胞工学 11, 29-38.

宮崎 香、東 昌市 (1996).

『マトリックスメタロプロテナーゼの構造と機能—特にがんの浸潤・転移における役割』
生化学 68(12) pp. 1791-1807.

茂木-豊泉 和枝、豊泉龍児 (2003).

『ニワトリ胚の初期胚盤葉における細胞陥入運動の研究』
神奈川大学総合理学研究所「年報2002」(ISSN 1342-0917) 所内共同研究報告 pp. 81-84.

Alexander, C. M., Hansell, E. J., Behrendtsen, O., Flannery, M. L., Kishnani, N. S., Hawkes, S. P. and Werb, Z. (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122, 1723-36.

Alexander, S. M., Jackson, K. J., Bushnell, K. M. and McGuire, P. G. (1997). Spatial and temporal expression of the 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) correlates with development and differentiation of valves in the embryonic avian heart. *Dev Dyn* 209, 261-8.

Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699-704.

Basset, P., Wolf, C. and Chambon, P. (1993). Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Treat* 24, 185-93.

Basset, P., Bellocq, J. P., Lefebvre, O., Noel, A., Chenard, M. P., Wolf, C., Anglard, P. and Rio, M. C. (1997). Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 26, 43-53.

Boucaut, J. C., Clavilier, L., Darribere, T., Delarue, M., Riou, J. F. and Shi, D. L. (1996). What mechanisms drive cell migration and cell interactions in *Pleurodeles*? *Int J Dev Biol* 40, 675-83.

Boulay, A., Masson, R., Chenard, M. P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J. P., Sautes-Fridman, C., Basset, P. and Rio, M. C. (2001). High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 61, 2189-93.

Cai, D. H., Vollberg, T. M., Sr., Hahn-Dantona, E., Quigley, J. P. and Brauer, P. R. (2000). MMP-2 expression during early avian cardiac and neural crest morphogenesis. *Anat Rec* 259, 168-79.

- Cai, D. H. and Brauer, P. R. (2002). Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases early cardiac neural crest migration in chicken embryos. *Dev Dyn* **224**, 441-9.
- Carinato, M. E., Walter, B. E. and Henry, J. J. (2000). *Xenopus laevis* gelatinase B (Xmmp-9): development, regeneration, and wound healing. *Dev Dyn* **217**, 377-87.
- Damjanovski, S., Ishizuya-Oka, A. and Shi, Y. B. (1999). Spatial and temporal regulation of collagenases-3, -4, and stromelysin -3 implicates distinct functions in apoptosis and tissue remodeling during frog metamorphosis. *Cell Res* **9**, 91-105.
- Damjanovski, S., Puzianowska-Kuznicka, M., Ishizuya-Oka, A. and Shi, Y. B. (2000). Differential regulation of three thyroid hormone-responsive matrix metalloproteinase genes implicates distinct functions during frog embryogenesis. *Faseb J* **14**, 503-10.
- Danker, K., Hacke, H., Ramos, J., DeSimone, D. and Wedlich, D. (1993). V(+)-fibronectin expression and localization prior to gastrulation in *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev* **44**, 155-65.
- Darribere, T., Riou, J. F., Shi, D. L., Delarue, M. and Boucaut, J. C. (1986). Synthesis and distribution of laminin-related polypeptides in early amphibian embryos. *Cell Tissue Res* **246**, 45-51.
- Duong, T. D. and Erickson, C. A. (2004). MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev Dyn* **229**, 42-53.
- Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J., Chambon, P. and Mark, M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**, 30-43.
- Hadeball, B., Borchers, A. and Wedlich, D. (1998). *Xenopus* cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech Dev* **72**, 101-13.
- Hensey, C. and Gautier, J. (1998). Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol* **203**, 36-48.
- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S. and Shi, Y. B. (1996). Transient expression of stromelysin-3 mRNA in the amphibian small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res* **283**, 325-9.
- Ishizuya-Oka, A., Li, Q., Amano, T., Damjanovski, S., Ueda, S. and Shi, Y. B. (2000). Requirement for matrix metalloproteinase stromelysin-3 in cell migration and apoptosis during tissue remodeling in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* **150**, 1177-88.
- Jung, J. C., Leco, K. J., Edwards, D. R. and Fini, M. E. (2002). Matrix metalloproteinases mediate the dismantling of mesenchymal structures in the tadpole tail during thyroid hormone-induced tail resorption. *Dev Dyn* **223**, 402-13.

Lee, G., Hynes, R. and Kirschner, M. (1984). Temporal and spatial regulation of fibronectin in early *Xenopus* development. *Cell* 36, 729-40.

Lefebvre, O., Regnier, C., Chenard, M. P., Wendling, C., Chambon, P., Basset, P. and Rio, M. C. (1995). Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development* 121, 947-55.

Levine, E., Lee, C. H., Kintner, C. and Gumbiner, B. M. (1994). Selective disruption of E-cadherin function in early *Xenopus* embryos by a dominant negative mutant. *Development* 120, 901-9.

Lijnen, H. R., Van Hoef, B., Vanlinthout, I., Verstreken, M., Rio, M. C. and Collen, D. (1999). Accelerated neointima formation after vascular injury in mice with stromelysin-3 (MMP-11) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2863-70.

Masson, R., Lefebvre, O., Noel, A., Fahime, M. E., Chenard, M. P., Wendling, C., Kebers, F., LeMeur, M., Dierich, A., Foidart, J. M. et al. (1998). In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol* 140, 1535-41.

McCawley, L. J. and Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13, 534-40.

Montero, J. A. and Heisenberg, C. P. (2003). Adhesive crosstalk in gastrulation. *Dev Cell* 5, 190-1.

Murphy, G., Segain, J. P., O'Shea, M., Cockett, M., Ioannou, C., Lefebvre, O., Chambon, P. and Basset, P. (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem* 268, 15435-41.

Nagel, M. and Winklbauer, R. (1999). Establishment of substratum polarity in the blastocoel roof of the *Xenopus* embryo. *Development* 126, 1975-84.

Nakatsuji, N. (1986). Presumptive mesoderm cells from *Xenopus laevis* gastrulae attach to and migrate on substrata coated with fibronectin or laminin. *J Cell Sci* 86, 109-18.

Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M. and Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114, 111-118.

Noel, A., Santavicca, M., Stoll, I., L'Hoir, C., Staub, A., Murphy, G., Rio, M. C. and Basset, P. (1995). Identification of structural determinants controlling human and mouse stromelysin-3 proteolytic activities. *J Biol Chem* 270, 22866-72.

Parks, W. C. and Shapiro, S. D. (2001). Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2, 10-9.

Patterson, D., Hayes, W. P. and Shi, Y. B. (1995). Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase gene stromelysin-3 coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis. *Dev Biol* 167, 252-62.

Ramos, J. W. and DeSimone, D. W. (1996). *Xenopus* embryonic cell adhesion to fibronectin: position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation. *J Cell Biol* 134, 227-40.

Ravanti, L. and Kahari, V. M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 6, 391-407.

Ray, J. M. and Stetler-Stevenson, W. G. (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7, 2062-72.

Rio, M. C., Lefebvre, O., Santavicca, M., Noel, A., Chenard, M. P., Anglard, P., Byrne, J. A., Okada, A., Regnier, C. H., Masson, R. et al. (1996). Stromelysin-3 in the biology of the normal and neoplastic mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1, 231-40.

Schatz, F., Krikun, G., Runic, R., Wang, E. Y., Hausknecht, V. and Lockwood, C. J. (1999). Implications of decidualization-associated protease expression in implantation and menstruation. *Semin Reprod Endocrinol* 17, 3-12.

Shi, Y. B. (1995). Cell-cell and cell-ECM interactions in epithelial apoptosis and cell renewal during frog intestinal development. *Cell Biochem Biophys* 27, 179-202.

Summerton, J. and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-95.

Suzuki, A. S., Tadano, Y., Yamamoto, T., Abe, S. I. and Tajima, T. (2001). Expression of a novel matrix metalloproteinase gene during *Cynops* early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 380-4.

Westermarck, J. and Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13, 781-92.

Winklbauer, R. and Keller, R. E. (1996). Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* 177, 413-26.

Wu, E., Mari, B. P., Wang, F., Anderson, I. C., Sunday, M. E. and Shipp, M. A. (2001). Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. *J Cell Biochem* 82, 549-55.

Yang, M., Murray, M. T. and Kurkinen, M. (1997). A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in *Xenopus laevis* early embryo development. *J Biol Chem* 272, 13527-33.