

発生過程における器官の退縮の分子機構

Molecular Mechanism of the Organ Regression during the Development

(日本動物学会推薦)

代表研究者 広島大学 矢尾板 芳 郎 Hiroshima University Yoshio YAOITA

協同研究者 広島大学 中 島 圭 介 Hiroshima University Keisuke NAKAJIMA

The tadpole tail, which is twice as long as the body, is induced to resorb completely by thyroid hormone within several days during the anuran metamorphosis. To investigate the underlying mechanism, we undertook two approaches. First, we examined the effect of dominant-negative thyroid hormone receptor (DNTR) on muscle cell death *in vitro*. The overexpression of DNTR suppressed the death of a tail-derived myoblastic cell line induced by thyroid hormone. Secondly, tadpole tails were injected with a reporter gene and the *DNTR* expression construct, and the reporter gene expression in muscle cells was followed during the spontaneous metamorphosis. DNTR overexpression inhibited a decrease of the reporter gene expression which began at stage 57 in the control tadpoles, but only delayed massive muscle cell death at stage 63 when tails shrink very rapidly. Some remained even a few weeks after the metamorphosis, although most of DNTR overexpressing cells died by the end of the metamorphosis. These results let us to propose that thyroid hormone induces the suicide of muscle cells (the cell-autonomous death) in the tail between stage 57 and 62, and that both the murder and suicide mechanisms execute muscle cell death in stage 62-64 to remove muscle promptly and completely.

研究目的

発生過程には様々な器官が形成されると同時に不要な器官は退縮、縮小する。器官の退縮は発生生物学上の重要な問題でありながら、よく研究されてきたのは授乳後乳腺退縮などだけである。そこでは細胞外基質を破壊する Matrix Metalloproteinase (MMP) の発現との関連性が論じられ、MMPの活性増大による細胞外基質の破壊により、膜蛋白質インテグリンを介する生存シグナルを受けられなくなり、アポトーシスを起こすものと考えられている。授乳後乳腺退縮の研究結果と同様に、両生類幼生の変態における尾や鰓の退縮にもMMPの発現の増大が原因と解釈されている。幼生の尾の鰭や鰓の器官培養の系で、甲状腺ホルモン処理によって collagenase 活性の上昇と器官の大きさの減少が観察されていることから、甲状腺ホルモンに

よる collagenase 合成が collagen の再構成に関わっていると想定されている。

無尾両生類の変態において、四肢の発達や尾と鰓の退縮など、ほとんど総べての器官が変化し、変態におけるこれらの変化は主に甲状腺ホルモンの血中濃度増加による。Don Brown 博士らにより退縮中の尾で甲状腺ホルモンによって発現が増減する多くの遺伝子がPCRを用いた subtractive hybridization により単離され、in situ hybridization により解析されている。stromelysin-3 や collagenase-3 などの細胞外基質を破壊する酵素は、筋組織をとりまく皮下線維芽細胞や、筋繊維が附着している筋腱結合部位では高く発現しているが、筋細胞では発現していない。これらのことから、甲状腺ホルモンにより分泌性の matrix metalloproteinase が増加し、細胞外基質を分解す

ることにより筋髄結合部位が破壊され、筋細胞が細胞外基質から離れ細胞死が起きると考えられ、これを murder model(他殺説)と呼ぶ。この説では、甲状腺ホルモンが分泌性蛋白質、例えば細胞外基質を分解する matrix metalloproteinase などを産生、分泌し、それが自分の回りの細胞や、自分自身を殺すというものである。

一方、私たちは、幼生の尾由来の筋芽細胞株 XLT-15を樹立し、それが甲状腺ホルモンによりアポトーシスを起こすことを報告している。この細胞を 10 nM の活性型甲状腺ホルモン T3 で 3 日間処理すると、TUNEL陽性の凝集した核が観察され、apoptosis で細胞死を起している。このことは尾の筋細胞が自律的に死ぬことを示唆しているために suicide model(自殺説)を支持する。しかし、この実験結果は培養系の実験によるものであり、細胞外基質と結合している in vivo の細胞の生理的死を反映していない可能性がある。更に、甲状腺ホルモン処理された筋芽細胞が分泌した可溶性の因子により、相互に殺している可能性も否定できない。

体長の 2 倍以上の運動器官である尾の退縮において、筋細胞が suicide model か murder model に従って死ぬのかを決めることは、極めて重要であり、その基本的な分子機構を解明することになる。

ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体

(DNTR)は甲状腺ホルモン反応性塩基配列には結合するが甲状腺ホルモンには付かないので、正常甲状腺ホルモン受容体による甲状腺ホルモン反応性遺伝子の転写を抑制し、甲状腺ホルモンのシグナル伝達を阻害する。suicide model と murder model を区別するために、全体の一部の細胞に DNTR遺伝子と reporter gene を発現させて甲状腺ホルモンで処理する。murder model では DNTRを発現していない細胞から細胞死誘導因子が分泌されるから、DNTRが発現している細胞も、していない細胞も全て死ぬ事になる。しかし、suicide model ではDNTRが発現していない細胞は死ぬが、DNTRが発現している細胞は生き残ることになり、区別がつくことになる (Fig. 1)。私たちはこの実験を培養細胞の系と生きている幼生の系で行ったので、ここに報告する。

研究経過と考察

reporter gene である GFP遺伝子と共に vector またはDNTR遺伝子を尾由来の筋芽細胞株XLT-15 に transfection して、3 日間、甲状腺ホルモン処理をした。vector が導入された細胞の甲状腺ホルモン処理では細胞死が起きたが、DNTR遺伝子の発現により細胞死が抑制された (Fig. 2A)。また、この細胞は甲状腺ホルモン処理により 92 kDa の gelatinase を分泌することが知られていた。先程の培養上清を zymography で gelatinase

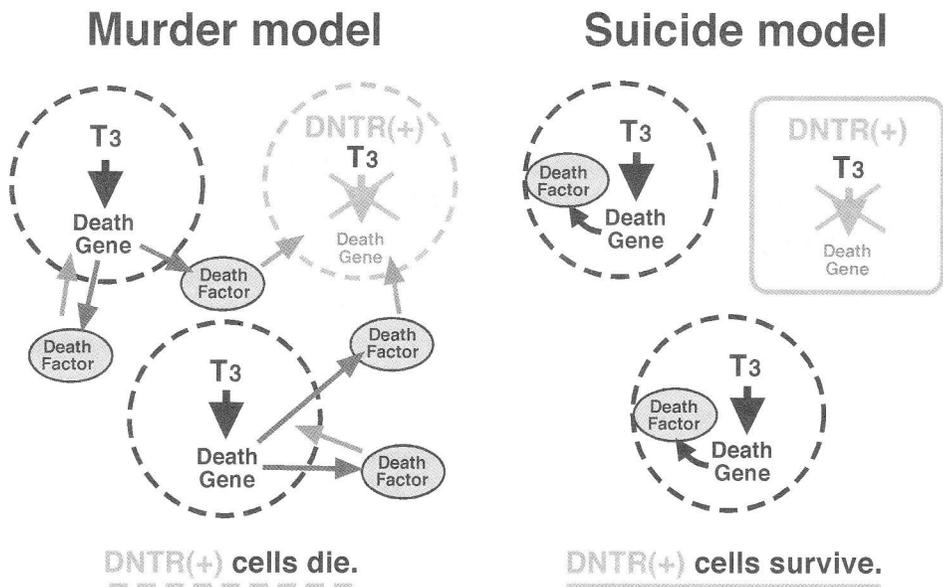


Fig. 1. The comparison of the murder model and the suicide model

活性を調べると、vector、DNTR遺伝子のどちらの transfection でも甲状腺ホルモン処理で同様の活性が検出された (Fig. 2B)。murder model が正しければ、分泌性の細胞死誘導因子がDNTRの発現に関わらず、同じ濃度存在することになり、DNTR 遺伝子の transfection により細胞死は抑制されないことになるが、そうではなかったことから、この実験結果は suicide model を強く支持した。

次に、生きている幼生の尾の筋細胞の甲状腺ホルモンによる細胞死が自殺か他殺かを確かめるための実験を筋組織へのDNA注入法を用いて行った。つまり、DNTR遺伝子と beta-galactosidase 遺伝子を Stage 58 の幼生の尾に注入し、尾が消失しかける stage 64 で殺し、reporter gene を発現している筋細胞を解析した (Table 1)。surviving とは DNTR 遺伝子を注入した側に beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞が stage 64 でも生存し、しかも反対側では筋細胞がすべて消失していた場合の尾の数で、dead は beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞が存在していなかった尾の数を示す。negative control の vector か luciferase 遺伝子と beta-galactosidase 遺伝子を注入した尾では青い細胞は生き残っていなかったが、アポトーシス阻害遺伝子 bcl-XL や DNTR 遺伝子を注入した細胞では beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞がよく生

存している事が観察された。このように DNTR 遺伝子と reporter gene の注入された筋細胞は生き残るが、甲状腺ホルモン受容体遺伝子をも一緒に注入すると筋細胞は観察されなかった。これは beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞の生存が DNTR による甲状腺ホルモンシグナルの阻害の結果であることを確認し、suicide model を支持する。

DNTR 遺伝子を注入した尾では stage 64 になると beta-galactosidase 活性を持つ細胞だけが生存しているだけで、それ以外は無細胞構造になっている。それが何で占められているのかを同定するために、各 stage の尾を基底膜の主成分である type IV collagen に対する抗体で染めてみた。type IV collagen のうち脊髄の回りに存在しているものは stage 64 まで変化していないが、脊索の回りには尾が急速に退縮する時に変性、消失していた。個々の筋細胞を囲んでいる collagen は筋細胞死につれて集合してきているように見え、stage 64 には脊髄以外の空間を占めていた。つまり、bcl-XL や DNTR 遺伝子を過剰発現している筋細胞だけが stage 64 には細胞外基質の中に浮いているものと考えられた。

reporter gene として beta-galactosidase 遺伝子を用いると特定の stage しか解析できないの

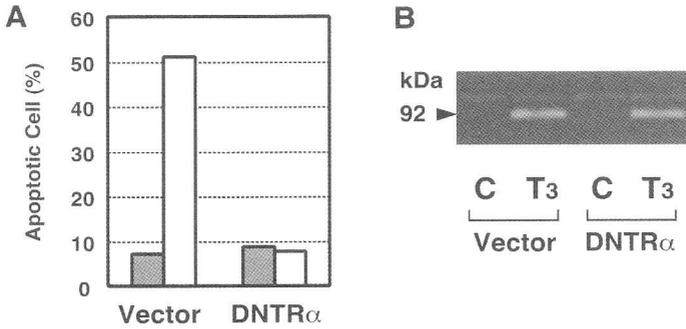


Fig. 2. The overexpression of DNTR inhibits TH-induced death of XLT-15-9 cells

Table 1. The inhibition of muscle cell death in stage 58-64 by the overexpression of DNTR.

	vector	luciferase	bcl-XL	DNTR	DNTR +vector	DNTR +TR
Surviving	0	0	6	10	4	0
Dead	12	19	8	1	2	6

で、代わりにGFP遺伝子を注入した。GFPによる蛍光減少は筋細胞死によるものであると考えて、生きていた幼生の尾での発生過程の間の筋細胞変化を観察してみた。GFP遺伝子と vector を打った尾では、急速に退縮する stage 63 においてGFPによる蛍光が急激に減少すると共に筋細胞の形が丸くなり、stage 64 にはほとんど消失していた (Fig. 3A)。DNTR遺伝子と共に注入した尾では、同様に stage 63 で筋細胞は丸くなるが、stage 64、65 での蛍光の減少が抑制され、10~20% ぐらいの筋細胞は変態後の stage 66 でも生存し続けた。この蛍光減少の抑制はDNTR遺伝子を 50 ng 打とうが、300 ng 打とうが同じだったので、DNTRの発現量は筋細胞内で飽和に達していると予測され、発現量の問題では無く、DNTR遺伝子の過剰発現だけでは筋細胞死を完全に阻害できないと考えられた。GFPとDNTR遺伝子を1つおきの筋節に注入すると、stage 63 にはGFP陰性の筋節が消失しGFP陽性の筋節が残り、その後、残った細胞も減少していった。このことは、DNTR発現による筋細胞の蛍光減少の抑制と筋細胞死の不完全な阻害を再確認した。従って、DNTR発現による蛍光減少の抑制や、尾が完全に消失した stage 66 以降のGFP陽性細胞の生存は suicide model を支持し、stage 64-65 での蛍光の減少の不完全抑制は murder model の正当性を示していると考えられた。つまり、stage 62 以降の筋細胞死では suicide model と murder model の両方が正しく、筋細胞は尾の退縮による張力の低下により丸くなると思われた。

次に実際、尾の筋細胞がいつから死んでいくか

を正確に調べるために、非常に若い (stage 54) 幼生の尾にGFP遺伝子と vector を注入して経過観察を行った。その結果、stage 57 から、つまり変態の climax の前から筋細胞が死に始める事が明らかになった。stage 57-62 の蛍光の減少はDNTR遺伝子注入によって完全に抑制できたので、同時期の細胞死はDNTR過剰発現によって阻害され、suicide modelに従う事が明らかになった。

GFPと vector を注入した筋細胞は stage 62 に、DNTRを注入した筋細胞は stage 63 に急激に死に始めるが、これらの細胞が anti-active caspase-3 抗体で認識されることから、どちらも apoptosis で死んでいく事が示された。

Matrix Metalloproteinase が尾の退縮や筋細胞死 (murder model) に関与していると考えられていた。その特異的阻害剤は尾の退縮を不完全にししか抑制できなかった。筋細胞死に関しては検討中である。また、TH処理された尾由来筋芽細胞株の cDNA library、それに特異的な subtraction library を作製し、現在、suicide gene のスクリーニング中である。

結論

両生類幼生では変態の climax 前の stage 57 から筋細胞死が始り、甲状腺ホルモンは stage 57-62 の間では尾の筋細胞の自殺 (細胞自律的な死) を誘導し、stage 62-64 では筋肉を急速に完全に取り除くために他殺と自殺の機序を介して筋細胞死を執行するという事を明らかにした (Fig. 4)。

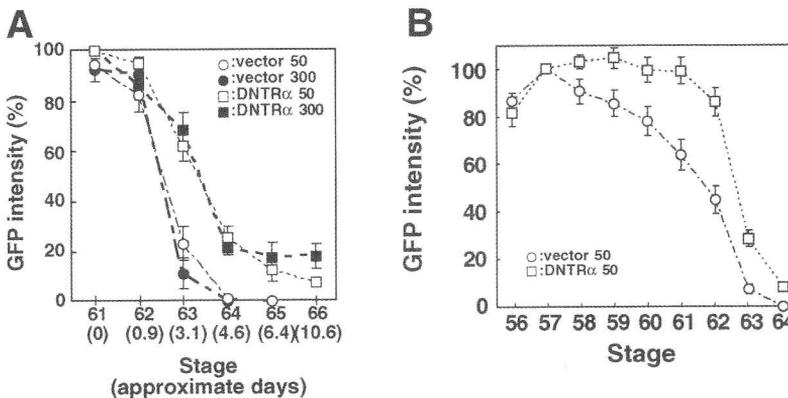


Fig. 3. The overexpression of DNTR inhibits PCD completely from stage 57 to stage 62 (B), and partially from stage 63 (A).

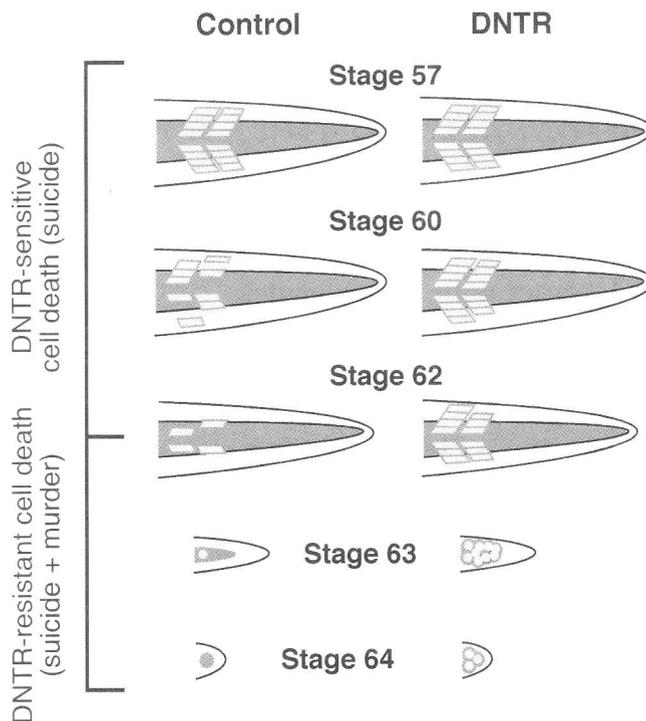


Fig. 4. Model of the mechanism of muscle cell death in the tail

研究発表

口頭発表

1. 矢尾板芳郎、中島圭介；両生類の変態で退縮する尾でおきている筋細胞死の分子機構、発生生物学会シンポジウム 6「動物の変態現象の仕組み」、日本発生生物学会第 35 回大会、2002. 5. 横浜
2. Yoshio Yaoita; Molecular Mechanism of Muscle Cell Death by Thyroid Hormone in Amphibian Tadpole Tail. Session 2 Frogs, International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2002, 2002, 11, Hiroshima
3. 中島圭介、矢尾板芳郎；両生類変態期の尾部退縮における筋細胞死の分子機構、第 25 回日本分子生物学会、2002, 12, 横浜
4. Yoshio Yaoita; Dual Mechanisms Governing Muscle Cell Death by Thyroid Hormone in Tadpole Tail during Amphibian Metamorphosis. Symposium "Regulation of Apoptosis during Insect and Amphibian Metamorphosis.", Sixth International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry,

2003, 2, Australia

誌上発表

1. Y. Yaoita; The inhibition of the nuclear transport of caspase-7 by its prodomain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 79-84, 2002
2. K. Nakajima and Y. Yaoita; Dual mechanisms governing muscle cell death in tadpole tail during amphibian metamorphosis. *Developmental Dynamics*, 2003, in press