

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659918

研究課題名(和文) DMP1の分子進化医学的研究

研究課題名(英文) Biological study on DMP1 based on molecular evolutionary medicine

研究代表者

新谷 誠康 (Shintani, Seikou)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90273698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：Dentin matrix protein 1 (DMP1)の分子進化を明らかにする為に、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; カエル)のDMP1遺伝子を同定し、その特徴とmRNA発現を分析した。その結果、四肢動物のDMP1分子は幾つかの共通の特徴を有していた。また、カエルDMP1 mRNAは羊膜類と同様に、主に骨細胞と象牙芽細胞において発現が認められ、エナメル芽細胞においても一時的な発現が認められた。以上は四肢動物においてDMP1の機能の幾つかが保存され、進化におけるDMP1機能の維持には、アミノ酸残基の配列よりも生化学的性質を維持することが重要であること示唆している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify and characterize an ortholog of the DMP1 gene in an amphibian (*Xenopus laevis*; *X. laevis*) to clarify molecular evolutionary alterations in DMP1. Furthermore, we analyzed the mRNA expression of this gene to elucidate its functional change in bone and developing tooth germ in comparison with amniote DMP1s. They shared several unique features specific to DMP1 and have similar properties. Expression of *X. laevis* DMP1 mRNA was predominant in osteocytes and odontoblasts, but only transiently observed in ameloblasts, as in amniotes. These results suggest that DMP1 has conserved several functions during tetrapod evolution. This indicates that continuity of biochemical properties has been more important in maintaining DMP1 functionality than that of the sequence of amino acid residues, which has undergone change over the course of molecular evolution.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：DMP1 分子進化 進化医学

1. 研究開始当初の背景

硬組織形成に重要な役割を担っている細胞外基質非コラーゲン性タンパク質の一つのカテゴリーに、その共通の性質から SIBLING と名付けられたファミリーが存在する。このファミリーは、オステオポンチン (SPP1)、Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)、骨シアロタンパク (IBSP)、象牙質シアロリン酸タンパク (DSPP)、細胞外基質リン酸糖タンパク (MEPE) からなり、ヒトやマウスの染色体上にクラスター状に配座している。さらに、SIBLING ファミリーはエナメル質タンパク質、唾液タンパク質、ミルクカゼイン遺伝子とともに分泌性カルシウム結合性タンパク質遺伝子群の巨大なクラスターを形成し、この全ての遺伝子が重複を繰り返すことによって、カンブリア紀 (5 億数千万年前) 以前に存在した共通の祖先遺伝子から進化した広義の遺伝子ファミリー (SCPP 遺伝子) であると考えられている。しかし、SCPP 遺伝子群という大きな分子進化過程を検証するためには、さらに骨や象牙質の基質タンパク質の分子進化的研究を進める必要がある。2006 年に今回研究対象とした DMP1 遺伝子の変異が常染色体性劣性低リン血症性くる病/骨軟化症の原因であることが発見され、現在でも注目されている。進化医学が“人の病気は進化の負の遺産である”とする考え方に則して、本研究は DMP1 の生物学的特徴をさらに解明し、医学的に役立てるとの考えのもと、立案された。

2. 研究の目的

進化に関する研究は生物学領域では発生や機能の解明において、多くの示唆に富む結果を生んでいる。進化は長い時間をかけて環境に合うように体が適応してきた歴史であるとも言え、変化した環境に適応できないものは消えていった。その過程において、ヒトの身体には従来生きていく上で役立つシステムであったにもかかわらず、環境の変化によって無用の長物に、あるいは有害に転じたシステムが多くある。歯科領域においてはあまり重要視されていないが、医科領域では人の病気は進化の負の遺産であると考えられ、病気の解明において極めて重要な情報を提供する研究として注目されている。SIBLING ファミリー遺伝子は硬組織形成と極めて関係が深く、SIBLING 遺伝子が脊椎動物の硬組織の進化に伴ってどのように変化してきたかを検討するのは非常に有意義である。DMP1 は主に骨細胞や象牙芽細胞で産生され硬組織の石灰化に関与する細胞外基質タンパク質である。生化学的に強酸性を示し、高度なリン酸化による負の荷電のため、 Ca^{2+} と高い結合能を有する。前述したように、DMP1 機能不全により、常染色体劣性低リン血症性くる病が発症することが明らかになり、DMP1 は生体のリン代謝にも大きく関わっていることが示唆されている。このように

生体で重要な機能を有すると考えられる DMP1 であるが、一方で進化速度が速い (アミノ酸配列が変化しやすい) という、分子進化的に矛盾した分子である。本研究では両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; *X. laevis*) における DMP1 のクローニングと遺伝子の構造解析および発現解析を行い、羊膜類のそれと比較することによって分子進化的に DMP1 の特徴の解明を試みた。

3. 研究の方法

X. laevis の顎骨よりトータル RNA を抽出し、cDNA を合成後、既知の動物の DMP1 塩基配列をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行い、その産物をシーケンスすることによって、*X. laevis* DMP1 の cDNA 塩基配列を得た。また、別にクローニングしたゲノム塩基配列と cDNA 塩基配列を比較することにより、DMP1 遺伝子の構造を明らかにした。次に心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、小腸、顎骨、脛骨、骨端骨、筋肉の各組織よりトータル RNA を抽出し、DMP1 の臓器別発現をリアルタイム PCR (RT-PCR) により検討した。さらに、脛骨、顎骨については *in situ* hybridization を行って、DMP1 mRNA の発現を観察した。

4. 研究成果

得られた塩基配列より推定された DMP1 のアミノ酸配列 (図 1) は哺乳類や爬虫類と比較して相同性は低いものの、推定されるタンパク質等電点、アミノ酸構成比率や性質 (表 1) は既知の DMP1 と酷似していた。同様に遺伝子構造に関しても相同性が認められた (図 2)。相同性の低さは DMP1 が進化速度の非常に速い分子であることを再認識させるものであった。一方で、このタンパク質の重要なクリベージサイト周辺や C 末端の部位は保存されていた (図 3)。このクリベージサイトはヒトで変異を起こすと前述した常染色体劣性低リン血症性くる病を引き起こすことが明らかとなっており、DMP1 が機能を発揮する上で、周辺領域の保存が非常に重要であることが分子進化医学的にも証明された。

RT-PCR では顎骨、脛骨、大腿骨骨頭において DMP1 が特異的に強く発現していた (図 4)。in situ hybridization では、mRNA 発現が骨芽細胞には認められず、骨細胞のみに認められた (図 5)。歯においては、象牙芽細胞に発現が認められたが、軟組織には発現していなかった (図 6、図 7)。この結果は羊膜類の骨や哺乳類の歯で報告されている DMP1 の発現様式とほぼ一致していた。しかし、本研究においては、*X. laevis* の歯胚において DMP1 の発現は初期から中期の歯胚の象牙芽細胞に多く認められ、後期になると発現が認められなくなることが明らかになった (図 6、図 7)。これは、哺乳類において

DMP1 は象牙質の形成だけでなく、その後の象牙質の添加や維持に関与するため、歯胚の形成段階に関わらず発現するが、*X. laevis*においてDMP1は象牙質の形成のみに関与し、その後の象牙質の添加や維持には関与しないことが示唆された。以上のことから、*X. laevis*のDMP1は骨や歯の形成及び骨の恒常性の維持に関与しており、各々の発育段階に応じて発現が厳密に調節され、その発現様式もほぼ保存されていることが示された。進化速度が早くアミノ酸配列の変化が大きい分子が両生類から哺乳類まで類似した発現形式や機能を担っていると考えられることから、DMP1はアミノ酸の配列よりもアミノ酸構成やそれによって生み出される生化学的性質が重要な分子であることが推測される。

表1 DMP1 推定アミノ酸配列の動物間比較

アミノ酸	カエル		ヒト		ウシ		マウス		オポッサム		ニワトリ		ワニ	
	AA残基数	AA残基数												
アルギニン	18	20	13	20	20	40	23	47	11	20	33	20	31	
アルミニウム	24	34	21	42	31	63	24	49	16	32	25	61	33	
アスロキニン	42	59	24	48	15	30	14	29	34	68	8	19	36	
アスロキニン様	78	110	65	131	64	130	64	131	61	122	59	143	86	
システイン	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	
グルタミン酸	101	142	77	155	78	158	73	150	81	162	59	143	76	
グルタミン	30	42	31	62	28	57	36	74	29	58	14	34	17	
グリシン	23	32	39	78	40	81	37	76	23	46	40	97	32	
ヒスチジン	29	41	10	20	12	24	8	16	12	24	13	31	39	
プロリン	30	42	8	16	3	6	4	8	8	16	2	5	17	
ロイシン	25	35	19	38	18	36	12	25	20	40	15	36	18	
リジン	57	80	19	38	15	30	11	23	30	60	9	22	40	
メチオニン	5	7	4	8	2	4	3	6	6	12	3	7	10	
フェニルアラニン	7	10	4	8	4	8	5	10	4	8	3	7	10	
トリプトファン	11	16	18	36	24	49	19	39	6	12	6	12	20	
セリン	136	191	108	217	97	196	114	234	117	234	75	182	122	
トレオニン	48	68	18	36	24	49	26	53	19	38	15	36	25	
トリプトファン	2	3	2	4	2	4	1	2	1	2	4	10	2	
チロシン	13	18	16	32	5	10	6	12	7	14	4	10	19	
シロリン	32	45	10	20	11	22	6	12	20	40	12	29	23	
合計	711	1000	497	1000	494	1000	487	1000	501	1000	413	1000	641	
推定分子量	Mr 79.7 kDa	Mr 54.0 kDa	Mr 53.7 kDa	Mr 52.2 kDa	Mr 55.5 kDa	Mr 44.0 kDa	Mr 55.5 kDa	Mr 44.0 kDa	Mr 55.5 kDa	Mr 44.0 kDa	Mr 44.2 kDa	Mr 44.2 kDa	Mr 44.2 kDa	
推定等電点	pI 4.33	pI 3.84	pI 3.95	pI 3.76	pI 3.96	pI 3.96	pI 3.96	pI 3.96	pI 3.91	pI 3.91	pI 4.42	pI 4.42	pI 4.42	

セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸に富むアミノ酸構成比率や推定されるタンパク質等電点、分子量は既知のDMP1と酷似している。

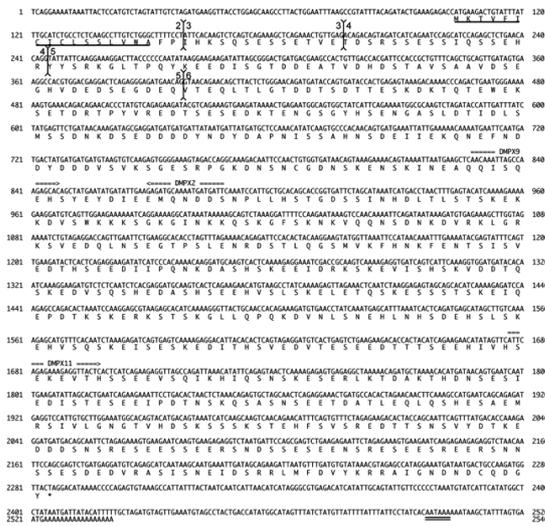


図1 *X. laevis* DMP1 遺伝子の DNA 配列と翻訳アミノ酸配列

アミノ酸残基は、IUPAC-IUB コードによって表記している。シグナル配列は、太線で、終止コドンはアスタリスク(*)で、ポリAシグナルは二重線で明示している。プライマーの設計位置は配列の上に矢頭付き二重線で指示している。垂線はエクソン境界の位置を示し、その両側にエクソン番号を表記

している。



図2 ヒト、マウス、ワニ、*X. laevis* DMP1 の遺伝子構造

エクソン(四角枠)はE1-E6で表記され、エクソンの翻訳領域の長さはアミノ酸数(枠内表記)によって示されている。黒塗り枠と白抜き枠はそれぞれ、エクソンの翻訳、非翻訳領域を表している。

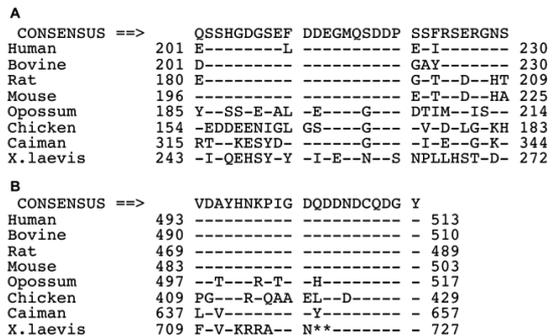


図3 ヒト、ウシ、ラット、マウス、オポッサム、ニワトリ、ワニ、*X. laevis* DMP1 の保存領域のアミノ酸配列アライメント

(A) DMP1 分子の中央部の N 末端側に位置する保存領域

(B) DMP1 分子の C 末端付近の保存領域 アミノ酸残基は、IUPAC-IUB コードによって表記している。番号は、シグナル配列の N 末端から何残基目かを表している。最上列にはコンセンサス配列を、それと一致するアミノ酸残基をダッシュ(-)で、欠失したアミノ酸残基をアスタリスク(*)で示す。

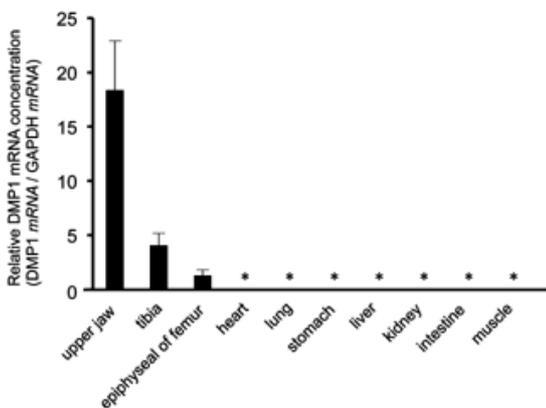


図4 器官別 DMP1 mRNA 発現の比較 GAPDH を内部コントロールにリアルタイム PCR によって計測した mRNA 発現の補正を

行った (mean±SEM, n=5)。DMP1 mRNA は上顎骨、脛骨、大腿骨骨端に高い発現が認められたが、心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、腸、筋肉ではほとんど発現が認められなかった (* ; 相対的濃度は 0,8 以下であった)。

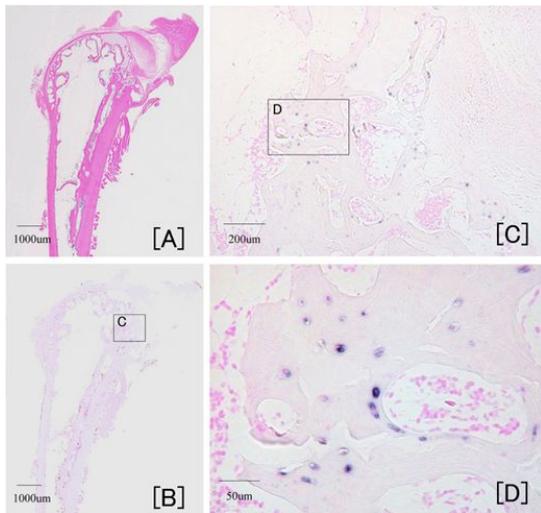


図5 脛骨における DMP1 mRNA の発現
[A] HE 染色
[B]-[D] *in situ* hybridization
[C] [B]中の C で表記された領域の強拡大
[D] [C]中の D で表記された領域の強拡大 ; 骨梁周囲の細胞には発現はなく、骨内に埋入した骨細胞にのみ発現が認められた。

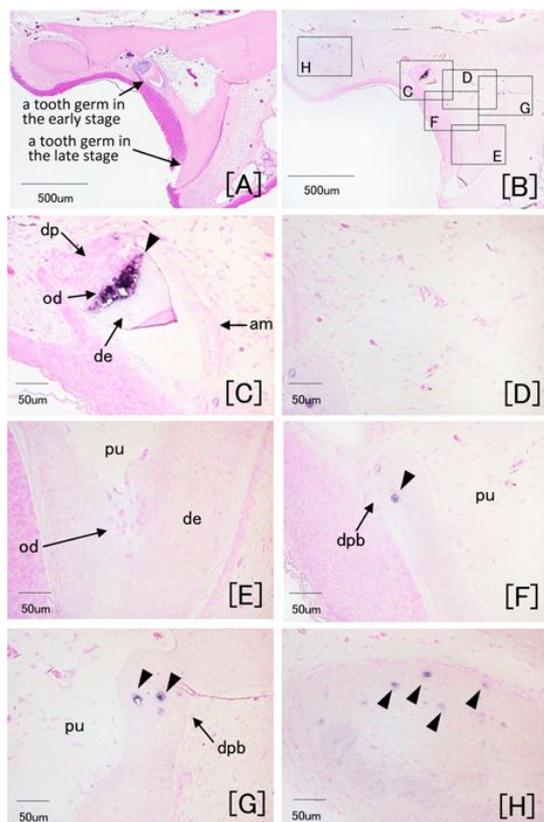


図6 歯胚成長期早期および晩期の上顎歯胚における DMP1 mRNA の発現

[A] HE 染色
[B]-[H] *in situ* hybridization
[C]-[H] [B]中の C-H で表記された領域の強拡大
[C] 歯胚成長期早期では DMP1 mRNA は象牙芽細胞のみに発現が認められ (矢頭) 他の歯の細胞には発現が認められなかった。
[D]-[G] 歯がほとんど口腔内の萌出しようとしている歯胚成長期晩期では歯の組織から DMP1 mRNA の発現は全く認められなかった。
[F][G] 歯足骨に埋入された骨細胞に DMP1 mRNA の発現が認められた (矢頭)。
[H] 顎骨に埋入された骨細胞に DMP1 mRNA の発現が認められたが (矢頭) 骨梁周囲の細胞には発現は認められなかった。
am : エナメル芽細胞、de : 象牙質 od : 象牙芽細胞、dp : 歯乳頭、pu : 歯髄、dpb : 歯足骨

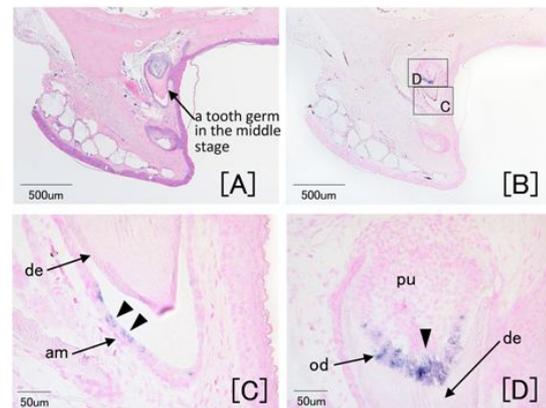


図7 歯胚成長期中期の上顎歯胚における DMP1 mRNA の発現

[A] HE 染色
[B]-[D] *in situ* hybridization
[C][D] [B]中の C および D で表記された領域の強拡大 ; エナメル芽細胞と象牙芽細胞以外の他の歯の細胞には DMP1 mRNA の発現が認められなかった。
[C] エナメル芽細胞の一部に DMP1 mRNA の発現が認められた (矢頭)。
[D] 象牙芽細胞に DMP1 mRNA の発現が認められた (矢頭)。
am : エナメル芽細胞、de : 象牙質 od : 象牙芽細胞、pu : 歯髄

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

新谷誠康, 知らずに日常臨床で遭遇している“MIH”を知る, ザ・クインテッセンス 33(1), 150-155, 2014 (査読無し)

Yonezu T, Arano-Kojima T,

Kumazawa K, Shintani S, Association between feeding methods and sucking habits: a cross-sectional study of infants in their first 18 months of life., Bull Tokyo Dent Coll. 2013;54(4):215-21. (査読有り)

Yonezu T, Kojima T, Kumazawa K, Shintani S, Longitudinal investigation of relationship between developmental changes in sagittal occlusion and caries in lower first permanent molars., Bull Tokyo Dent Coll. 2013;54(4):209-13. (査読有り)

Yonekura T, Homma H, Sakurai A, Moriguchi M, Miake Y, Toyosawa S, Shintani S, Identification, characterization, and expression of dentin matrix protein 1 gene in *Xenopus laevis*., J. Exp. Zool. 2013;320(8):525-537. (査読有り)

Tsujino K, Yonezu T, Shintani S, Effect of combination of fused teeth on eruption of permanent successors., Pediatr Dent. 2013;35(2):64-7. (査読有り)

今井裕樹、新谷誠康, 乳歯が生えてきた！ぱっちりわかるここからのケア & 指導 知っておきたい！この時期の歯の異常・萌出に関する異常・構造の異常, 歯科衛生士 37(4), 58-59., 2013 (査読無し)

新谷誠康, 乳歯の癒合歯が後継永久歯に与える影響, 日本歯科医師会雑誌 65(12), 6-14. カラーグラビア p.1, 2013. (査読無し)

大西智之, 久喜富美子, 新谷誠康, 今井裕樹, 柴木正実, 自閉症者に対し糸身体抑制法を選択するための基準, 障歯誌, 33(4): 632-639, 2012. (査読有り)

Sato A, Dongak R, Hao L, Shintani S, Sato T, Organization of *Mhc* class II *A* and *B* genes in the tilapiine fish *Oreochromis niloticus* and evidence for their co-evolution., Immunogenetics, 2012 Sep;64(9):679-690. (査読有り)

Sawada T, Ishikawa T, Shintani S, Yanagisawa T, Ultrastructural immunolocalization of dentin matrix protein 1 on Sharpey's fibers in monkey tooth cementum., Biotech Histochem, 2012 Jul;87(5):360-365. (査読有り)

Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S, Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological

study., Clin Oral Investig. 2012 Jun;16(3):835-842. (査読有り)

Sekiguchi H, Senzui S, Yamashita H, Shintani S, Sawada T, Yanagisawa T, Missense mutation of *EDA1* gene in Japanese family with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia., Ped. Dent. J. 2012 22 (2); 188-192. (査読有り)

Imai H, Kubo S, Sasaki J, Shintani S, Marginal periodontitis with alveolar bone loss in lower deciduous incisor due to drinking straw-like plastic tube: Three case reports., Ped. Dent. J. 2012 22(1); 84-89. (査読有り)

新谷誠康, 知っておいて頂きたい小児歯科, 千葉小児科医会雑誌 43, 3-8., 2012 (査読無し)

新谷誠康, う蝕と見誤っていませんか？ 見えてきたエナメル質形成不全症の実態, 歯科衛生士 36(12), 56-61., 2012

新谷誠康, 歯質の形成異常 (日本小児歯科学会 50 周年記念特集 小児歯科研究最前線), 小児歯誌 (創立 50 周年記念誌) 48-49., 2012 (査読無し)

新谷誠康, 歯質の形成異常 (日本小児歯科学会 50 周年記念特集 小児歯科研究最前線), 小児歯科臨床 17(9):18-24., 2012

桜井敦朗, 新谷誠康, 口腔細菌に対する宿主免疫応答と疾患への関与, 小児歯誌 50(1), 22-30., 2012 (査読無し)

〔学会発表〕(計 3 件)

米倉智子、本間宏実、桜井敦朗、森口美津子、見明康雄、豊澤悟、新谷誠康, 両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル)における DMP1 遺伝子の同定および発現解析, 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013.9.22 (2009.9.20-9.22)

米倉智子、本間宏実、桜井敦朗、森口美津子、見明康雄、豊澤悟、新谷誠康, 両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル)における DMP1 遺伝子の同定および発現解析, 第 51 回日本小児歯科学会 岐阜 2013.5.24 (2013.5.23-5.24)

米倉智子、本間宏実、桜井敦朗、森口美津子、見明康雄、豊澤悟、新谷誠康, *Xenopus laevis* の硬組織石灰化に関する DMP1 の発現解析, 第 294 回東京歯科大学学会総会 千葉-東京 2012.10.20 (2012.10.20-21)

〔図書〕(計 2 件)

新谷誠康 (分担執筆), 編集: 住友雅

人、木下淳博、沼部幸博、村松英雄、歯科臨床イヤーノート 2014～Section 8 小児歯科 5.高頻度治療 603-608、クインテッセンス出版株式会社、東京、分担、2013.3.10
新谷誠康（分担執筆）、総編集：大関武彦、古川 漸、横田俊一郎、水口 雅、今日の小児 治療指針 第 15 版、小児歯科・口腔外科疾患 歯周疾患 855-857.、医学書院、東京、分担、2012.2.15

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

招待講演

新谷誠康：エナメル質の形成障害、上海市口腔病防治院、上海市口腔医学会口腔予防専門部会、上海市予防医学会口腔衛生保健専門委員会等の教唆腕開催される国家継続医学教育の『口腔公衆衛生活動の技術とその成績に関する評価法の講習会』、上海（中華人民共和国） 2013.10.22

新谷誠康：エナメル質形成不全の実態とその治療 教育講演、第 32 回 日本小児歯科学会近畿地方会 奈良 2013.9.29

新谷誠康：子どもの口腔ケア 講演、千葉県医師会「子どもの生活習慣病研修」千葉 2013.3.23

新谷誠康：遺伝性エナメル質形成不全症の注意点と予防的治療 講演、第 2 回臨床ゲノム医療学会 名古屋 2012.12.16

新谷誠康：小児科医に知っておいていただきたい小児歯科 講演、千葉県小児科医会 7 月例会 千葉 2012.7.21

新谷誠康：歯の遺伝性障害、エナメル質形成不全症と象牙質形成不全症 講演、第 12 回ゲノムドクター&キャスター東京セミナー 東京 2012.7.8

新谷誠康：歯科医師の身近な先天異常-遺伝性エナメル質形成不全症 講演、第 293 回東京歯科大学学会例会特別講演 千葉 2012.6.2

新谷誠康：歯質の形成異常 講演 第 50 回日本小児歯科学会記念大会リレー講演□「小児歯科学研究最前線」、第 50 回日本小児歯科学会 東京 2012.5.12（2012.5.12-5.13）

(2)研究分担者

桜井 敦朗 (SAKURAI, atsuo)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90431759

(3)連携研究者

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

新谷 誠康 (SHINTANI, seikou)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90273698