

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670890

研究課題名(和文) アメロラスチンの進化医学的研究

研究課題名(英文) Biological study on ameloblastin based on 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アメロラスチンはエナメル質形成に重要な役割を担っているエナメル質特異的タンパク質である。本研究の結果、アフリカツメガエル(カエル)のアメロラスチンmRNAの発現はエナメル芽細胞に特異的であった。羊膜類と同様にエナメル質形成において、カエルアメロラスチンのN末ペプチドとC末ペプチドの分布は異なっていることが示された。アメロラスチンは両生類から羊膜類への進化過程において、その独特のクリベージメカニズムを保持し、N末ペプチドとC末ペプチドはそれぞれ異なった機能を担うという機構を取り続けてきたことが示唆された。このことは3億5千万年にわたる進化過程において保存されてきたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ameloblastin (AMBN) is an enamel specific protein that plays critical roles in enamel formation. Expression of *Xenopus laevis* (*X. laevis*) AMBN mRNA was observed only in ameloblasts. An immunohistochemical study showed the distribution of the N-terminal peptides of *X. laevis* AMBN was different from that of the C-terminal peptides during enamel formation. The results indicated that *X. laevis* AMBN was an ameloblast-specific matrix protein that may initially be cleaved into two groups, N- and C-terminal peptides, as shown in amniotes. Consequently, it is suggested that AMBN have kept its original cleavage mechanism and N- and C-terminal peptides have served the respective different functions during the evolutionary transition from amphibian to amniote. It might have been conserved in both lineages during 350 million years of evolution.

研究分野：小児歯科学

キーワード：アメロラスチン AMBN 進化医学

## 1. 研究開始当初の背景

エナメル質の基質タンパク質であるアメリロプラスチン(AMBN)、エナメルリン(ENAM)、アメリロチン(AMTN)などは、硬組織形成に重要な役割を担っている非コラーゲン性タンパク質群(SIBLING)に属するオステオポンチン(SPP1)、デンチンマトリックスタンパク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)とともにヒトやマウス等の哺乳類のみならず、爬虫類や両生類においても同一染色体上に配座し、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、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。なかでも、AMBN遺伝子はそのロックアウトマウスの歯が重度のエナメル質形成不全を起こし、ヒトでは常染色体性劣性エナメル質形成不全症の原因の1つであることが判明している。AMBNが我々の病気といかに関わっているのかを見極めるためには、それぞれの分子が進化の途上において発現と機能をどのように変遷させてきたかを知る必要がある。この研究は今注目されている“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、AMBNの生物学的特徴を解明し、医学的に役立つとの考えのもと、立案された。

## 2. 研究の目的

進化は長い時間をかけて環境に合うように生体が適応してきた歴史であり、変化した環境に適応できないものは種として絶滅していった。このことは生体を構成する分子においても当てはまる。進化の過程において、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。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。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。

AMBN遺伝子はそのロックアウトマウスの歯が重度のエナメル質形成不全を起こし、ヒトでは常染色体性劣性エナメル質形成不全症の原因の1つであることが判明している。AMBNのエナメル質形成における機能に関しては、哺乳類の歯における発現解析の結果からさまざまな推測が加えられてきた。代表的なものとしては

- (1) エナメル質の成熟期において他の基質タンパク質が分解・吸収されるなか、AMBNがエナメル小柱鞘に最後まで残

存することから、AMBNがエナメル小柱鞘構造の構築に関与している。

- (2) AMBNはクリベージされ、N末ペプチドとC末ペプチドに分解され、前者は基質形成期にエナメル基質に存在し、石灰化期に消失するのに対して、後者は両期ともエナメル芽細胞とエナメル基質界面に存在することから、N末ペプチドは基質形成と石灰化に、C末ペプチドはエナメル芽細胞とエナメル基質の接着に関与している

などである。

これらの機能がはたして両生類のエナメル質形成においても発揮されているのか、あるいは変遷しているのかを知るためにはAMBNの機能の何が重要で、何が保存されてきたのかを進化医学的に紐解くことが重要である。特に、(1)に関しては哺乳類以外では一部のトカゲ以外にはエナメル小柱が存在しないことから、AMBNの進化過程においてエナメル小柱に関与する機能が獲得されたのか、そもそもエナメル小柱とは関係ないのかは非常に興味深い。一連の研究で、この分子の特徴が明らかになれば、今後のエナメル質形成不全症の研究や治療における着目点が代わる可能性すらある。本研究では両生類のアフリカツメガエル(カエル; *Xenopus laevis*)における発現解析を行い、羊膜類のそれと比較することによって両生類AMBNの特徴の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

麻醉下にカエルの上顎骨から作成した標本に、カエルAMBN遺伝子配列をもとに作成したRNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、両生類のエナメル質形成各ステージにおけるAMBN遺伝子の発現部位と発現タイミングを探索した。また、カエルAMBN推定アミノ酸配列をもとに作製したペプチドに対してポリクロナール抗体を作製した。AMBNが哺乳類などでN末およびC末ペプチドの機能が異なるとされているため、抗体を作製するにあたってカエルアメリロプラスチンのN末領域およびC末領域に推定アミノ酸配列をもとにその配列と一致するペプチドを作製した(それぞれN末抗体、C末抗体)。これらを用いて両生類のエナメル質形成各段階におけるAMBNの発現部位とその動態(変遷)をstreptavidin-biotin complex(SABC)法による免疫組織化学的染色によって探索した。この実験は東京歯科大学動物実験委員会の承認(No. 272304、282302)を得て行った。

## 4. 研究成果

*in situ*ハイブリダイゼーションでは、AMBN遺伝子はエナメル質形成期の初期、中期、晩期を通じてエナメル芽細胞に局限して発現し、歯の萌出期にはいかなる細胞にも発

現は認められなかった。また、発現はエナメル質形成期の初期と中期には強く認められたが、晩期には減弱し、一部のエナメル芽細胞からは発現がほぼ消失していた(図1)。

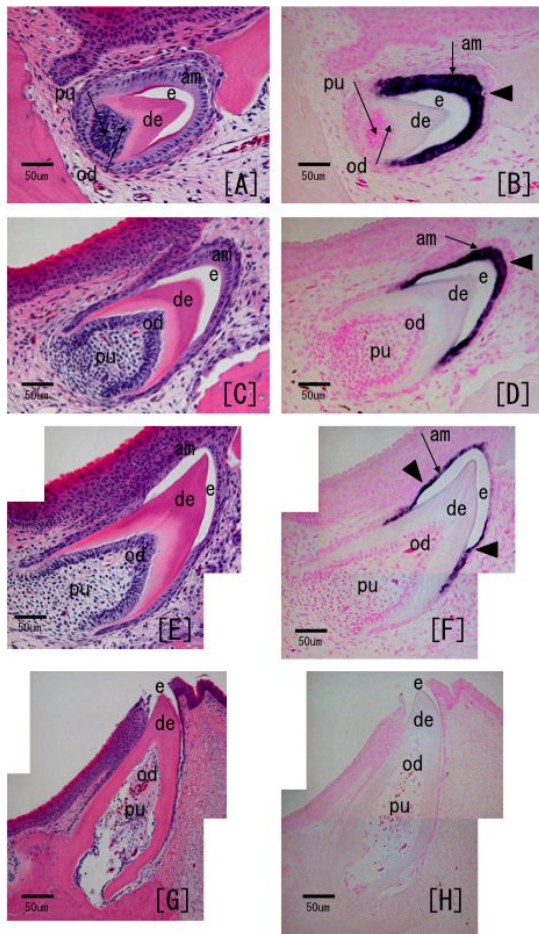


図1 各形成過程における AMBN mRNA の発現を示す *in situ* ハイブリダイゼーションの結果

[A] [C] [E] [G] HE 染色  
[B] [D] [F] [H] *in situ* ハイブリダイゼーション

[A] [B] エナメル質形成期初期  
[C] [D] エナメル質形成期中期  
[E] [F] エナメル質形成期晩期  
[G] [H] 萌出期

[B] AMBN mRNA の発現はエナメル芽細胞に局限して認められる(矢頭)。  
[D] AMBN mRNA の発現はエナメル芽細胞に局限して認められる(矢頭)。  
[F] AMBN mRNA の発現はエナメル芽細胞に局限して認められる(矢頭)ものの、唇側を中心に発現が認められないエナメル芽細胞が存在する。  
[H] AMBN mRNA の発現は認められない。  
am : エナメル芽細胞、e : エナメル質、de : 象牙質 od : 象牙芽細胞、dp : 歯乳頭、pu : 歯髄

N 末抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果では、エナメル質形成期の初期と中期を通してエナメル芽細胞とわずかに残ったエ

ナメル基質、外套象牙質に AMBN-N 末ペプチドの存在が確認された。また、エナメル質形成期の初期にはエナメル芽細胞とエナメル質の境界部に AMBN-N 末ペプチドが認められたが、中期には認められなかった(図2)。一方で C 末抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果では、エナメル質形成期の初期と中期を通してエナメル芽細胞に AMBN-C 末ペプチドの存在が確認された(図3)。また、両期を通じて象牙芽細胞にも微弱な反応が認められた。

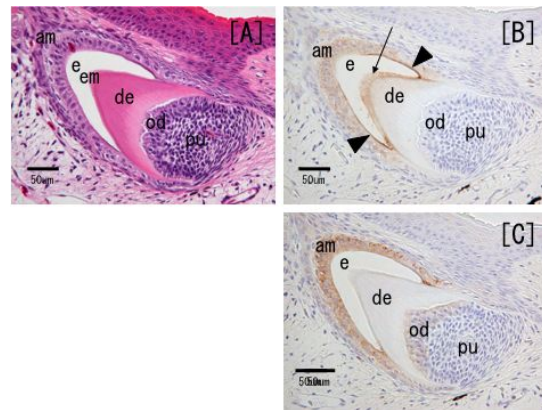


図2 エナメル質形成期初期における抗 AMBN ペプチド抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果

[A] HE 染色  
[B] 抗 AMBN-N 末ペプチド抗体による免疫組織化学的染色。エナメル芽細胞、歯頸部側エナメル質(より未成熟なエナメル質)とエナメル芽細胞の境界(矢頭)、外套象牙質(矢印)に反応が認められる。  
[C] 抗 AMBN-C 末ペプチド抗体による免疫組織化学的染色。エナメル芽細胞に反応が認められ、象牙芽細胞にも微弱な反応が認められる。

am : エナメル芽細胞、e : エナメル質、de : 象牙質 od : 象牙芽細胞、dp : 歯乳頭、pu : 歯髄

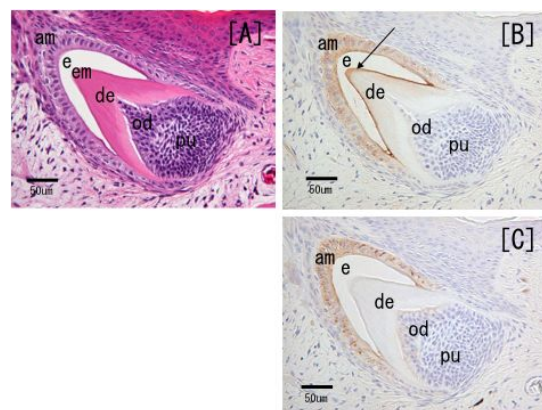


図3 エナメル質形成期中期における抗 AMBN ペプチド抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果

[A] HE 染色  
[B] 抗 AMBN-N 末ペプチド抗体による免

疫組織化学的染色。エナメル芽細胞、外套象牙質（矢印）に反応が認められる。  
[C] 抗 AMBN-C 末ペプチド抗体による免疫組織化学的染色。エナメル芽細胞に反応が認められ、象牙芽細胞にも微弱な反応が認められる。

am : エナメル芽細胞、e : エナメル質、de : 象牙質 od : 象牙芽細胞、dp : 歯乳頭、pu : 歯髄

これらの結果から、羊膜類において示されたように、カエルにおいても AMBN がエナメル芽細胞特異的である事が遺伝子の発現とタンパク質の発現の双方から確認された。一方で、エナメル小柱構造との関連が示唆されてきた哺乳類および一部の爬虫類と異なっており、大部分の爬虫類と同様に AMBN が歯の何らかの構造と関係しているような所見は認められなかった。また、細かな分布領域は羊膜類とは異なっているものの、カエルと哺乳類の共通の祖先は AMBN を N 末ペプチドと C 末ペプチドの 2 種のペプチドに分割し、機能させる方法をすでに採用していたと考えられる。アメロプラスチンの主要な機能は双方の系統の進化において 3 億 5 千万年にわたって保持されて来たと推察できる。

#### 引用文献

Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM, Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization. *Cells Tissues Organs* 186, 2007, 7-24.  
Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y., Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell. Biol.*, 167, 2004, 973-983.  
Poulter JA, Murillo G, Brookes SJ, Smith CE, Parry DA, Silva S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ, Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta., *Hum Mol Genet.*, 23(20), 2014, 5317-5324.  
Shintani S, Kobata M, Toyosawa S, Ooshima T, Expression of ameloblastin during enamel formation in a crocodile., *J Exp Zool B Mol Dev Evol.*, 2006 306(2), 2006, 126-133.  
Shintani S, Kobata M, Toyosawa S., Fujiwara T, Sato A, Ooshima T, Identification and characterization of ameloblastin gene in a reptile. *Gene*, 283, 2002, 245-254.  
Shintani S, Kobata M, Toyosawa S, Ooshima T, Identification and characterization of ameloblastin gene in

an amphibian, *Xenopus laevis.*, *Gene*, 318, 2003, 125-136.,  
Toyosawa S, Fujiwara T, Ooshima T, Shintani S, Sato A, Ogawa Y, Sobue S, Ijuhin N, Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. *Gene*, 256, 2000, 1-11.

#### 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7件)

Kanemoto T, Imai H, Sakurai A, Dong H, Shi S, Yakushiji M, Shintani S, Influence of Lifestyle Factors on Risk of Dental Caries among Children Living in Urban China., *Bull Tokyo Dent Coll*, 査読有, 57(3), 2016, 143-157.

Tanaka-Kumazawa K, Kikuchi Y, Sano-Kokubun Y, Shintani S, Yakushiji M, Kuramitsu HK, Ishihara K, Characterization of a potential ABC-type bacteriocin exporter protein from *Treponema denticola.*, 査読有, *BMC Oral Health.*, 2016, 16;17(1):18. doi: 10.1186/s12903-016-0243-7.

Imai H, Makiguchi T, Arakawa A, Tashiro A, Yonezu T, Shintani S, Alveolar Growth of Japanese Infants -Comparison between Now and 40 Years Ago-, *Bull Tokyo Dent Coll*, 査読有, 58(1), 2017, 9-18.

浦野絢子、岩田美奈子、小鹿裕子、荒井 亮、櫻井敦朗、辻野啓一郎、大多和由美、新谷誠康、東京都心の歯科大学小児歯科における歯の外傷に関する実態調査、*小児歯誌*、査読有、53(3)、2015、414-420.

熊澤海道、川上響子、新谷誠康、半埋伏の上顎第二乳臼歯に開窓術を施して萌出をみた 1 例、*歯科学報*、査読有、2015、115、425-433.

Sano Y, Okamoto-Shibayama K, Tanaka K, Ito R, Shintani S, Yakushiji M, Ishihara K., Dentilisin involvement in coaggregation between *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia.*, *Anaerobe*, 査読有, 23:30C, 2014, 45-50. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.08.008.

Ishioka M, Ishizuka Y, Shintani S, Yanagisawa T, Inoue T, Sasaki J, Watanabe H., Expression profiles of NOS isoforms in gingiva of nNOS knockout mice., *Tissue & Cell*, 査読有, 46(2), 2014, 122-126.

(学会発表)(計7件)

実験的炎症性嚢胞のメカニズムの解明、中内彩乃、井上 孝、新谷誠康、第 302 回 東京歯科大学学会総会 東京

2016.10.15 (2016.10.15-10.16)  
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、米倉智子、本間宏実、桜井敦朗、見明康雄、新谷誠康、第 59 回日本口腔科学会中部地方部会 松本 2016.9.11 (2016.9.11)  
象牙芽細胞の感覚受容機能発現に関する発生学的研究 第一報、田中亜生、澁川義幸、石川 昂、田崎雅和、山本 仁、新谷誠康、第 58 回歯科基礎医学会 札幌 2016.8.26 (2016.8.24-8.26)  
Immunohistochemical observation for multirooted tooth formation in rat., Osawa E, Yamazaki T, Yamamoto H, Shintani S, 25th IAPD (International Association of Paediatric Dentistry) 2015, July 1-4 (June 4), Glasgow, UK.  
ラット臼歯における根分岐部形成に関する発生学的研究 Developmental studies on the tooth root furcation area in rat molar., 大澤枝里、山本 仁、新谷誠康、第 53 回日本小児歯科学会 広島 2015.5.21 (2015.5.21-22)  
ラットの根分岐部形成に関する組織学的研究、大澤枝里、山崎貴季、山本 仁、新谷誠康、第 56 回歯科基礎医学会 福岡 2014.9.26 (2014.9.25-9.27)  
Developmental studies on the multirooted tooth formation in rat., Osawa E, Yamazaki T, Yamamoto H, Shintani S, 9th PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia), 2014 Aug 23 (2014 Aug 22-24), Singapore.

〔図書〕(計 8 件)

新谷誠康 (分担執筆) 編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学ベーシックテキスト、第 1 章 小児歯科学の意義と目的、第 4 章 歯の発育と異常、永末書店、京都、分担、2016.1.11  
今井裕樹 新谷誠康、編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学ベーシックテキスト、第 2 章 心身の発育、永末書店、京都、分担、2016.1.11  
桜井敦朗 新谷誠康、編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学ベーシックテキスト、第 11 章 齲蝕の予防と進行抑制、永末書店、京都、分担、2016.1.11  
辻野啓一郎、新谷誠康、編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学ベーシックテキスト、第 13 章 歯内療法、永末書店、京都、分担、2016.1.11  
桜井敦朗 新谷誠康、編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学ベーシックテキスト、第 1 章 予防填塞と小児の歯冠修復 1 .フィッシャーシーラント (予防填塞)、永末書店、京都、分担、2016.1.11  
辻野啓一郎、新谷誠康、編集主幹: 新谷誠康、小児歯科学クリニカルテキスト、第 2 章 歯内療法、永末書店、京都、分担、

2016.1.11  
辻野啓一郎、新谷誠康 (分担執筆) 編集: 北村和夫、岩淵博史、飯野文彦、田中晃伸、坪田有史、日常臨床のレベルアップ&ヒント 72、8 章 小児歯科 02 効率的で確実なフィッシャーシーラント 140-141、デンタルダイヤモンド社、東京、分担、2015.12.1  
新谷誠康 (分担執筆) 総編集: 水口 雅、市橋 光、崎山 弘、今日の小児 治療指針 第 16 版、27.小児歯科・口腔外科疾患歯の発育と萌出、904-905、医学書院、東京、分担、2015.9.1

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
学会等主催

10th PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia) in conjunction with 54th Japanese Society of Pediatric Dentistry (JSPD), 2016 May 26-28, Tokyo. Chairman: Seikou Shintani, Secretary General: Taku Fujiwara, Committee: Yoshinobu Asada, Satoshi Fukumoto, Ryu Hayakawa, Haruaki Hayasaki, Hiroyuki Karibe, Shigenari Kimoto, Kenshi Maki, Shinichiro Maruyama, Takehiko Shimizu, Tetsuo Shirakawa, Hiroko Takano, Akinobu Tanaka, Eiichi Tanaka, Youichi Yamasaki, Yasutaka Yawaka

招待講演

新谷誠康: もう一度確認したい小児歯科 東京、東京都杉並区学校歯科医会講演会 2016.10.26  
新谷誠康: もう一度確認したい小児歯科、東京歯科大学同窓会千代田支部 (三水会) 講演会 東京 2016.3.16  
新谷誠康: 小児の歯科治療、第 90 回東京歯科大学同窓会宮城県支部・学術講演会 2015.4.25  
新谷誠康: 小児歯科診療の実際、茨城県鹿行歯科医師会学術講演会抄録 鹿島 2014.12.7

シンポジウム

新谷誠康: 四肢動物のエナメル質の分子進化、サテライトシンポジウム 2 「エナメル蛋白遺伝子群の系統発生学的解析 魚類から哺乳類まで」、オーガナイザー: 川崎和彦、石山巳喜夫、第 57 回歯科基礎医学会、新、2015.9.11 (2015.9.11-13) (シンポジウム)  
Seikou Shintani: Caries Prevalence and Caries Prevention Strategies from

Infancy to Adolescence in Japan.(Synposium), “Caries Preventive Programmes in Asia: From Infancy to Adolescence”, 9th PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia), 2014 Aug 24 (2014 Aug 22-24), Singapore.

新谷誠康：歯の発生と異常、シンポジウム  
4「歯と口腔の成長と発育」、オーガナイザー：渡部 茂、第 61 回小児保険協会学術集会、福島、2014.6.22 (2014.6.20-22)

## 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

### (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

### (4) 研究協力者

なし