

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792085

研究課題名 (和文) 歯胚発生に関わる遺伝子の研究

研究課題名 (英文) Research on some genes of tooth germ initiation.

研究代表者

本田 淳也 (HONDA JUNYA)

九州大学・歯学研究院・医員

研究者番号：21792085

研究成果の概要 (和文)：

マウス歯胚歯根形成期にて *in situ* hybridization 法を行った。その結果、歯根形成期に Pgk1 遺伝子並びに ATPase6 遺伝子の mRNA 発現が認められた。Pgk1 の実験結果として、歯根形成初期では内エナメル上皮、外エナメル上皮に mRNA 強発現が認められた。歯根形成後期では象牙芽細胞、エナメル芽細胞に局限した mRNA 強発現を認めた。ATPase6 の実験結果として、Pgk1 と同様に歯根形成初期では、内エナメル上皮および外エナメル上皮に局限した mRNA 強発現を認めた。歯根形成後期では象牙芽細胞、外エナメル上皮、エナメル芽細胞への mRNA 強発現が認められた。

研究成果の概要 (英文)：

We study *in situ* hybridization of the root formation stage of mouse tooth germ. The result of our study shows mRNA expression of Pgk1 and ATPase 6 in tooth germ. As the result of Pgk1, it shows mRNA expression in internal epithelium and outer epithelium at initial root formation. And then, Pgk1 mRNA expression was in the enamelblast and odontoblast cells at the post stage of root formation. The result of ATPase6 similar to Pgk1, it shows mRNA expression in internal epithelium and outer epithelium at initial root formation. And then, ATPase6 mRNA expression was in the enamelblast, outer epithelium, and odontoblast cells at the post stage of root formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：矯正歯科

科研費の分科・細目：矯正歯科

キーワード：tooth germ, phosphoglycerate kinase 1, ATPase 6

## 1. 研究開始当初の背景

*Pgk1*, *ATPase6* はともに ATP 産生に関与する因子であるため、すべての細胞に均等に発現がみられるはずである。しかし、歯胚発生過程における ISH 法の結果は特に歯胚上皮に強発現を示していた(J Honda et al., 2008)。

*Pgk1* は解糖系以外にプラスミン還元酵素としてアンギオスタチン産生を制御しており、毛細血管新生に関与しているという報告もある。よって、これまでに報告されている増殖因子や分化誘導因子のみでは説明のつかない歯胚発育機構に *Pgk1*, *ATPase6* は関与している可能性がある。この2つの因子に焦点を当てた本研究は分子機構の空白を埋める特色があり、独創的な点でもある。歯胚の発生から歯根完成までの過程で、*Pgk1*, *ATPase6* の遺伝子発現、タンパク発現を検索することは、細胞へのエネルギー供給機構解明に必要不可欠であり、歯胚発現現象の複雑なシステムのキーファクターとなりうる。予想される結果として、歯根形成期では1) ISH 法により増殖・分化の盛んな細胞に *Pgk1*, *ATPase6* 遺伝子は発現し、2)mRNA 発現と類似したタンパク発現を免疫組織化学染色により示すものと考察される。

## 2. 研究の目的

歯胚歯根形成期における *Pgk1*, *ATPase6* の遺伝子について mRNA レベルでの歯胚細胞への発現を確認することを目的とする。さらに、それぞれの遺伝子についてタンパク局在を歯胚で確かめることである。

## 3. 研究の方法

(1) *Pgk1* のラベリングプローブの作製

- ①プローブ塩基配列の設計
- ②cDNAの作製
- ③RNA抽出および精製
- ④RNA濃度検定
- ⑤PCR
- ⑥second PCR
- ⑦DNA濃度検定
- ⑧Nucreotrap (DNA精製)
- ⑨DIG ラベリング
- ⑩プローブの濃度検定
- ⑪-20° にて保存

(2) *ATPase6* のラベリングプローブの作製

- ①プローブ塩基配列の設計
- ②cDNAの作製
- ③RNA抽出および精製
- ④RNA濃度検定
- ⑤PCR
- ⑥second PCR
- ⑦DNA濃度検定
- ⑧Nucreotrap (DNA精製)
- ⑨DIG ラベリング
- ⑩プローブの濃度検定
- ⑪-20° にて保存

## (3) 凍結切片用ブロックの作製

- ①妊娠マウスの購入および飼育
- ②体齢20日の胎仔頭蓋を採取、生後2日、4日、6日、8日、10日、2週齢、4週齢、6週齢の新生仔頭蓋を採取。
- ③4%PFAによる固定
- ④組織脱灰処理
- ⑤凍結包埋
- ⑥-80° にて保存

## (4) 凍結切片の作製

6～8 μmに薄切

## (5) in situ hybridization法

## (6) 蛍光免疫染色法

## (7) ウェスタンブロッティング法

## (8) 免疫沈降法

## 4. 研究成果

歯根形成期に着目し、マウス歯胚を用いて *in situ* hybridization法を行った。その結果、歯根形成期にPgk1遺伝子並びにATPase6遺伝子の発現が認められた。Pgk1の実験結果として、生後0日齢では内エナメル上皮および外エナメル上皮に局限した強発現を認めた。また、歯胚間様に弱い発現が認められた。生後2日齢において、内エナメル上皮および象牙芽細胞に局限した強発現が認められた。外エナメル上皮への発現はやや弱い。生後4日齢では、象牙芽細胞およびエナメル芽細胞への発現が認められた。生後6日齢において、象牙芽細胞への弱い発現が認められ、エナメル芽細胞への強発現が認められた。生後8日、10日齢においては、ヘルトウィッチ上皮細胞に発現が認められた。ATPase6の実験結果として、Pgk1と同様に生後0日齢では内エナメル上皮および外エナメル上皮に局限した強発現を認めた。また、歯胚間様に弱い発現が認められた。生後2日齢において、外エナメル上皮に局限した強発現が認められた。生後4日齢では、象牙芽細胞および外エナメル上皮への発現が認められた。生後6日齢において、象牙芽細胞への弱い発現とエナメル芽細胞への強発現が認められた。生後8日、10日齢においては、ヘルトウィッチ上皮細胞に発現が認められた。しかしながら両遺伝子は、歯胚の成長に伴い発現は認められるものの、歯胚発生初期ほどの強発現を示さなかった。

*In situ* hybridization法で得られた結果について、さらなる考察を深めるため、現在マウス歯胚歯根形成期のタンパク実験を遂行中である。実験手技として、蛍光免疫染色法、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法を行う予定である。

#### 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 2件)

(1) *In situ* expression of 15 kDa interferon alpha responsive gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar.

Merina Akhter • Ieyoshi Kobayashi • Tamotsu Kiyoshima • Kengo Nagata • Hiroko Wada • Yukiko Ookuma • Hiroaki Fujiwara • Jyun-ya Honda • Hidetaka Sakai

J Mol Hist (2010) 41:185–191

(2) *In situ* expression of the mitochondrial ATPase6 gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar.

Jun-ya Honda • Ieyoshi Kobayashi • Tamotsu Kiyoshima • Kengo Nagata • Hiroko Wada • Yukiko Ookuma • Hiroaki Fujiwara • Maho Shiotsuka • Ichiro Takahashi • Hidetaka Sakai

J Mol Hist

DOI 10.1007/s10735-010-9309-z

Received: 1 October 2010 / Accepted: 24

December 2010

© Springer Science+Business Media B.V. 2011

[学会発表] (計 1件)

(1) 第69回日本矯正歯科学会  
2010.9.27~29. (横浜)

歯胚における phosphoglycerate kinase (Pgk) 1 タンパクの局在とその新しい役割について

本田淳也<sup>1,2</sup>、小林家吉<sup>2</sup>、坂井英隆<sup>2</sup>、高橋一郎<sup>1</sup>

1. 九州大学歯学研究院 咬合再建制御学分野 (矯正歯科)  
2. 九州大学歯学研究院 口腔顎顔面病態病理学分野 (口腔病理)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本田 淳也 (HONDA JUNYA)  
九州大学・大学院歯学研究院・医員  
研究者番号：21792085

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：