

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19592106  
 研究課題名（和文）ACP ディファレンシャルディスプレイ法によるエナメル芽細胞関連遺伝子の研究  
 研究課題名（英文）Identification of gene expressions during rat amelogenesis using ACPDD RT-PCR method

研究代表者 河野 芳朗（KAWANO YOSHIRO）  
 新潟大学・医歯学系・助教  
 研究者番号：60303129

## 研究成果の概要：

エナメル芽細胞は分化の過程でその形態、性質が大きく変化する。このエナメル芽細胞の分化の過程で発現量の変化する遺伝子を同定するために、基質形成期エナメル芽細胞と成熟期エナメル芽細胞を分離、採取し、アニーリングプライマーディファレンシャルディスプレイ法（ACP-DD）を用いて増幅される発現遺伝子パターンを比較した。同定された 39 個の遺伝子のうち 21 個の遺伝子のこれまでに歯牙組織では全く報告されていない遺伝子であった。その中の一つ、カルサイクリンのラット切歯および臼歯におけるエナメル芽細胞の分化における発現プロファイルを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎医学

キーワード：ディファレンシャルディスプレイ 歯牙発生 エナメル芽細胞 カルサイクリン  
 象牙芽細胞 セメント芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ある遺伝子がどのような生命現象に関わっているかを明らかにすることが遺伝子の機能解析である。遺伝子の機能解析のためには、その遺伝子がどのようなタンパクをコードし、かつ、そのタンパクの発現時期および発現場所（組織・器官等）を明らかにすることが重要である。遺伝子の発現を調べる方法としては、転写レベルでの発現を調べるのが一般的である。

エナメル質形成過程におけるエナメル芽細胞の分化、細胞動態に関与する遺伝子・タンパクについては、これまで、形態学的のみならず、生化学的に多くの研究がなされてき

た。しかしながら、これまでの研究手法では、未知のエナメル芽細胞に発現している遺伝子・タンパク質を対象とするには、分離精製可能な十分な発現量の確保が不可欠であった。このため、分離精製限度以下しか発現していない新たな遺伝子・タンパク質の発見は不可能である。従って、歯牙組織で既に発現が知られた遺伝子・タンパクを対象としたり、他組織で発現が知られている遺伝子・タンパクについて、文献上の検討の後、盲目的に調べてみたり、あるいは、他組織を対象としていた実験中、偶然、歯牙組織に発現がみられることにより、新しい知見がもたらされるということも少なくなかった。このような旧来

の研究アプローチによるエナメル質形成関連遺伝子・タンパクの研究は、分離精製可能な程度の発現量がある遺伝子・タンパクおよび既知遺伝子・タンパクを対象とした研究に制限されてきたのが実情であった。

分子生物学的手法では、遺伝子転写産物をゲル上に視覚化することにより、特異的な発現パターンを指標に未知の遺伝子をクローニングすることがしばしば行われる。その一つにディファレンシャルディスプレイ法 (Differential Display: DD 法) がある。本方法は、任意の配列のプライマーを PCR (polymerase chain reaction) に用いることで、複数の未知の cDNA 断片を同時に増幅し、ゲル電気泳動で展開した後、得られたフィンガープリントのサンプル間の比較により、特異的な発現パターンを示す分子種を同定する方法である。DD 法には 2 種類以上のサンプルを比較して希少なものと、微妙な変化を示すものを含め、さまざまな挙動を示す転写物を同時に検出できるという利点がある。その反面、旧来の DD 法には、転写物の全体をカバーするには数百通り以上の反応が必要であること、また、PCR 反応における偽陽性反応が多いことが大きな問題となっていた。

近年のめざましい分子生物学的手法の進歩により、DD 法にも新しい技術が応用され始め、ACP リンカーをプライマーに組み込むことにより偽陽性反応を劇的に減少させる新しい DD 実験系、ACP<sup>TM</sup> 法 (Annealing Control Primer) が可能となった。

## 2. 研究の目的

改良された ACP-DD 実験系を利用して、エナメル質形成中に複雑な分化過程を経るエナメル芽細胞について、特に、基質形成期と成熟期に発現される遺伝子を比較し、発現量に差のみられる遺伝子をスクリーニングし、その発現量を Real-time PCR で確認後、その遺伝子、タンパク質の局在を組織学的検索することによってその遺伝子の機能を解析する。

## 3. 研究の方法

8 週齢ウイスターラット 16 匹から、エナメル器の 2 つの領域からエナメル器を分けて収集し、領域ごとにトータル RNA を抽出した。

### ACP-based PCR

発現に差の見られる遺伝子を GeneFishing<sup>TM</sup> DEG キット (Seegene, Seoul, South Korea) を用いて ACP-based PCR 法 (Kim *et al.*, 2004) で選別した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで分離しエチジウムブロマイドで可視化した。

### ダイレクトシークエンス

発現に差の見られたシンドを再増幅、抽出の後、シークエンスを行った。

### NCBI BLAST 相同検索

発現に差の見られた遺伝子のシークエンスの相同性を検索した。

### Calcydin 遺伝子定量 PCR

エナメル質形成における各領域の calcydin 遺伝子の発現量を比較するために GAPDH を内在性コントロールとして Applied Biosystems 7000 Real Time PCR System を用いて定量 PCR を行った。

## 免疫組織化学

胎生 15 日齢から 21 日齢の Wistar 系ラット、上顎第 1 大白歯を用いた。一次抗体として Calcydin rabbit polyclonal IgGs (1:100) 二次抗体として biotinylated anti-rabbit IgG (1:100) を用い、ABC 法、DAB にて発色した。対比染色として 0.03% methyl green or 0.05% methylene blue を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 発現に増加の見られた遺伝子。

領域	数	DEG 番号
Segment 1 基質形成期	24	1, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 37, 38, 39
Segment 2 成熟期	15	2, 4, 6, 7, 9, 13, 17, 19, 21, 22, 23, 27, 31, 34, 36
Total	39	

基質形成期の発現が多かったものが 24 個、成熟期に発現が増加した遺伝子が 15 個あった。

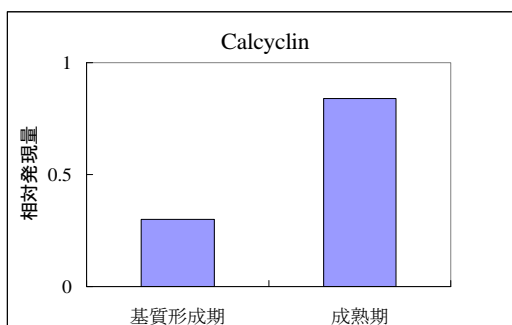
(2) 発現に差の見られた遺伝子の相同検索の結果。

Fragment No.	Product length	Homology	Genbank accession no.
DEG1	273	96%	>###
DEG2	422	99%	>###
DEG3	613	100%	>###
DEG4	579	100%	>###
DEG5	678	81%	>###
DEG6	258	100%	> gb BC086583.1  Rattus norvegicus ferritin light chain 1, mRNA
DEG7	612	99%	>emb AJ005394.1 RNJ005394 Rattus norvegicus mRNA for collagen alpha 1 type V
DEG8	259	100%	>emb Z50084.1 RNAMELIN2 R. norvegicus mRNA for amelin 2
DEG9	364	100%	>emb Z50083.1 RNAMELIN1 R. norvegicus mRNA for amelin 1
DEG10	348	100%	>gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus strain Wistar amelogenin precursor (Amel) mRNA
DEG11	717	100%	>###
DEG12	320	99%	>gb BC127507.1  Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1, mRNA
DEG13	484	100%	>###
DEG14	360	100%	>gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus strain Wistar amelogenin precursor (Amel) mRNA
DEG15	254	100%	>emb Z50084.1 RNAMELIN2 R. norvegicus mRNA for amelin 2
DEG16	581	99%	>###
DEG17	374	100%	> gb AF140232.1  Rattus norvegicus calcium binding protein (S100A6), mRNA
DEG18	294	100%	> ref NM_019154.1  Rattus norvegicus amelogenin X chromosome (Amelx), mRNA
DEG19	586	100%	> gb BC086583.1

Rattus norvegicus ferritin light chain 1, mRNA			
DEG20	329	100%	>###
DEG21	606	100%	>###
DEG22	612	100%	>###
DEG23	390	100%	>###
DEG24	287	100%	>###
DEG25	251	99%	
>gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus strain Wistar amelogenin precursor (Amel) mRNA			
DEG26	396	100%	>###
DEG27	404	99%	> gb BC087039.1
Rattus norvegicus procollagen, type III, alpha 1, mRNA			
DEG28	546	100%	
>gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus strain Wistar amelogenin precursor (Amel) mRNA			
DEG29	963	99%	>###
DEG30	264	100%	>###
DEG31	340	100%	>###
DEG32	247	100%	
>gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus strain Wistar amelogenin precursor (Amel) mRNA			
DEG33	598	99%	
>emb Z50084.1 RNAMELIN2 R. norvegicus mRNA for amel2			
DEG34	553	100%	>###
DEG35	423	100%	>###
DEG36	408	00%	> gb BC086583.1
Rattus norvegicus ferritin light chain I, mRNA			
DEG37	356	100%	
> gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus amelogenin precursor (Amel), mRNA			
DEG38	444	00%	
> gb U01245.2 U01245 Rattus norvegicus amelogenin precursor (Amel), mRNA			
DEG39	338	100%	
>###			

39 個の発現に違いの見える遺伝子が同定された。39 個の遺伝子のうち 18 個の遺伝子が既にエナメル質形成に関与することが報告されている遺伝子であった。DIG17 はカルサイクリンで、歯牙組織に発現することを初めて報告する遺伝子である。

(3) リアルタイム PCR による DIG17 カルサイクリンの基質形成期と成熟期での遺伝子発現量の違い。



カルサイクリンの発現は成熟期に多く発現していた。免疫組織学的検索により、カルサ

イクリンは成熟期エナメル芽細胞、さらに象牙芽細胞にも発現が観察された。

#### 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)

- 1) Saito S, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Hoshino M, Saito C, Maeda T : Immunohistochemical detection of nestin in the periodontal Ruffini endings of the rat incisor. Neurosci. Lett., 2009 in press. (査読有り)
- 2) Iizuka N, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Nandasena BGTL, Okiji T, Maeda T : Differential cell-specific location of Cav-1 and Ca<sup>2+</sup> ATPase in terminal Schwann cells and mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament of the rat incisor. J. Anat., 2009 in press. (査読有り)
- 3) Jabbar S, Harada F, Aita M, Ohishi M, Saito I, Kawano Y, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Maeda T : Involvement of neurotrophin-4/5 in regeneration of the periodontal Ruffini endings at the early stage. J. Comp. Neurol., 501 : 400-412, 2007. (査読有り)
- 4) Igarashi Y, Aita M, Suzuki A, Nandasena T, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T : Involvement of GDNF and its receptors in the maturation of the periodontal Ruffini endings. Neurosci. Lett., 412(3) : 222-226, 2007. (査読有り)
- 5) Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Niwano M, Kawano Y, Maeda T : The expression of caveolin-3 in the fibroblast-like type B synoviocytes in the rat temporomandibular joint. Anat. Rec. (Hoboken), 290(3) : 238-242, 2007. (査読有り)
- 6) Nandasena BGTL, Suzuki A, Aita M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T : Immunolocalization of aquaporin-1 in the mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament. Brain Res., 1157 : 32-40, 2007. (査読有り)
- 7) Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, Saito C, Kawano Y, Maeda T : The expression and production of vascular

endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 36(10): 928-933, 2007. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9件)

1. 河野芳朗他: ヘルトビッチの上皮鞘の断裂に伴うアクアポリン1陽性細胞の出現とネスチンの発現. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2008. 9. 23-25.
2. 木下-河野承子他: ラット臼歯歯根象牙芽細胞におけるアクアポリン1の一過性の発現. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2008. 9. 23-25.
3. Ferrer VLS et al.: Dlx5 overexpression stimulates odontoblast differentiation and function. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Quebec, Canada, 2008. 9. 12-16.
4. 河野承子他: ラット臼歯発生過程におけるアクアポリン1 (AQP1) の発現. 第46回日本小児歯科学会大会, 埼玉, 2008. 6. 12-13.
5. 河野芳朗他: ラット臼歯発生におけるカルサイクリンの発現. 第113回日本解剖学会総会・全国学術大会, 大分, 2008. 3. 27-29
6. Ferrer VLS et al.: Dlx5 overexpression promotes early odontoblast maturation. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Honolulu, Hawaii, 2007. 9. 16-19.
7. Kawano Y et al.: Identification of calcyclin expression in rat amelogenesis using ACP DDRT-PCR method. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Honolulu, Hawaii, 2007. 9. 16-19.
8. 河野芳朗他: セメント質, 歯槽骨に近接する歯根膜細胞におけるアクアポリン1 (AQP1) の発現. 第49回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 2007. 8. 29-31.
9. 河野芳朗他: ACPディファレンシャルディスプレイ法によるエナメル質形成に関与する遺伝子の検索ーラット切歯におけるCacyclin (S100A6) の発現. 第112回日本解剖学会総会・全国学術大会, 大阪, 2007. 3. 27-29.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
河野 芳朗 (KAWANO YOSHIRO)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 60303129

(2) 研究分担者  
前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 40183941

井上 佳世子 (野澤 佳世子) (INOUE KAYOKO)  
新潟大学・医歯学系・特任准教授  
研究者番号: 90303130

(3) 連携研究者  
なし