

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791600

研究課題名（和文） マウス第三臼歯欠損に關与する遺伝子検索

研究課題名（英文） Genetic analysis of absence of the third molar in mice

研究代表者

清水 武彦（SHIMIZU TAKEHIKO）

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：40328761

研究成果の概要：マウスに発症する先天欠如歯の原因となる遺伝子突然変異を解明するため、マウスの交配実験と遺伝子解析実験を行った。その結果、遺伝子変異が存在する染色体領域を第3番染色体の中間領域に限定し、候補となる遺伝子を5つに限定することができた。これら5つの遺伝子に突然変異があるかどうかを調べたところ、構造領域には変異はなく、このことより調節領域に変異が存在する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	600,000	0	600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	210,000	1,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・矯正・小児歯科学

キーワード：先天欠如歯，マウス，遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて先天欠如歯は最も一般的な口腔異常の1つであり、歯列咬合の異常を引き起こすことから、その原因を探求することは重要である。ヒトの先天欠如歯は遺伝性であることが多く報告されており、これまでにMSX1とPAX9遺伝子変異が遺伝性の先天欠如歯の原因として報告されている。しかし、これらは多数歯の極めて特異的な欠損パターンを示しており、最もよく見られる側切歯、小臼歯、第三大臼歯の欠損の原因は未知のままである。

ELマウスは100%の頻度で第三臼歯を先天的に欠損しており、ヒト第三大臼歯の欠如の最適なモデルである。ELマウスに発症する第三臼歯の先天欠如の原因遺伝子が、マウス染色体3番に存在することを申請者はこれまでに報告してきた。ELマウスにおける先天欠如歯の原因解明に対する研究は、国内外においても殆んど行なわれておらず、申請者らによる形態学的、遺伝学的研究の論文報告のみであった。ELマウス以外の先天欠如歯を有するミュータントマウス（Tabby、crinkledなど）に関しては原因遺伝子が解明されているが、ELマウスとの関連は否定されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EL マウスに発症する第三臼歯の先天欠如の原因遺伝子の解明であり、研究期間中にマウス欠如歯の原因遺伝子が存在する染色体領域を1メガベース（全ゲノムの約 1/3000 の範囲）まで限定し、候補遺伝子を約 10 遺伝子に限定することを目的とした。またそれらの候補遺伝子の変異解析を行い、先天欠如歯の原因となる遺伝子変異を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 先天欠如歯の候補遺伝子の選出

申請者がすでに作成したコンジェニックマウスに EL マウスを交配することにより、am3 領域内で染色体組み換えを生じさせ、その子孫に歯の欠如がみられるかどうかを観察することにより、am3 領域をさらに狭い範囲に限定することができる。しかしながら、5メガベース内で染色体組み換えが起こる確率は低く、1/20 程度であり、さらに1メガベースまで範囲を限定すると、1/100 であると考えられる。そのため、コンジェニックマウスの交配により 100 匹のマウスを作成し、これらのすべてマウスを生かしたまま尾から DNA を抽出した。am3 領域内で染色体組み換えが生じたかどうかを調べるために、PCR-電気泳動法を用いた。PCR のために用いる DNA マーカーは、am3 領域の複数の遺伝子内に設定し作成した（表 1）。染色体組み換えにより、EL マウスの欠如歯原因遺伝子が存在する染色体領域を正常マウスと置換できたなら、EL マウスの先天欠如歯の発症を救済できる、すなわち 100% 先天欠如を持つ EL マウスに歯を出現させることができると考えられる。この結果より、am3 領域をより狭い範囲に限定し、候補遺伝子の選出を行った。

(2) 候補遺伝子の変異解析

選出した候補遺伝子の変異解析は、EL マウスおよび対照の DNA を用い、エクソン領域の塩基配列の決定をシーケンシング法にて行った。各遺伝子の全てのエクソンを増幅するための PCR プライマーを設計した。PCR にて五遺伝子の全てのエクソンを増幅後、ダイレクトシーケンシング法にて、塩基配列を決定し、対象と比較し遺伝子変異があるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 先天欠如歯の候補遺伝子の選出

染色体組み換えを生じた第 1 0 世代のコンジェニックマウス（N10）の歯の欠損状態を観察した。図 1 に示すように、Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域が EL ホモ型である N10c マウスでは、2 歯以上の第三臼歯の欠損率は 100%（16/16）であった。これに対し、Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域がヘテロ型である N10a マウスでは、2 歯以上の第三臼歯の欠損率は 44%（16/36）に低下し、Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域が MSM ホモ型である N10b マウスでは、2 歯以上の第三臼歯の欠損率は 0%（0/13）であった。この結果より、am3 が Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域であることが明らかとなった。すなわち、am3 領域をマウス第 3 番染色体のセントロメアより 130.7 - 131.7 メガベースペア（Mb）の 1 Mb の領域に限定することができた。この領域内には図 2 に示すように Lef1, Hadh, Cyp2u1, Sgms2, Papss1 の 5 遺伝子のみが存在していた。このため、これらの 5 遺伝子のいずれかが、EL マウスの第三臼歯の先天欠如発症に関与していることが明らかとなった。これら 5 候補遺伝子の中で、特に Lef1 は歯の発生において重要な役割を演じていることが報告されており、Lef1 が EL マウスの先天欠如歯の強力な候補遺伝子であることが示唆された。

また、Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域がヘテロ型である N10a と Pseudogene49622 と Dkk2 の間の領域が MSM ホモ型である N10b マウスに出現した第三臼歯欠損数は上顎の方が下顎より優位に少なかった（表 1）。この結果より、am3 は上下顎ともに影響するが、上顎の第三臼歯に対する効果が高いことが明らかとなった。左右差は認められなかった。

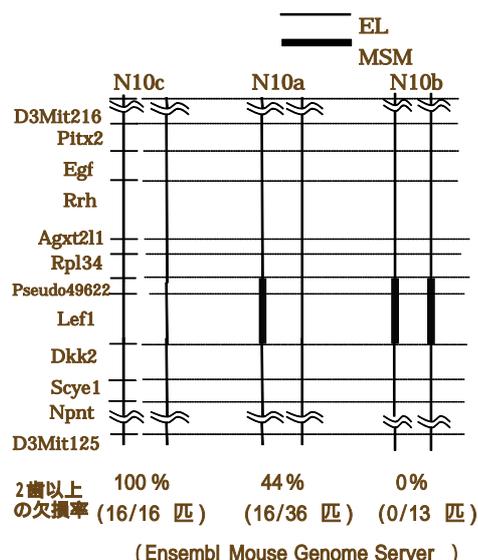


図1 N10マウスの第三臼歯2歯以上の欠如率

表1 遺伝子型判定に用いたDNAマーカー

遺伝子	ForwardPrimer	ReversePrimer
Pitx2	gaacgtgaaccaagggtggg	tggcaccactgtaaacgac
Egf	gaccctaaagggtttttgc	ggaggaggaacaggtgagg
Rrh	ggactttccaccgagaagaa	cccaggtagatcccattg
Agxt211	gtctgtgatggaaggggca	gatactgacaggggttctcc
Rpl34	tcctctgcttccacaggttg	cctggtttagcgcctcctcg
49622	gtgacgggatgggaataagca	gcccatcagaatagatgtcc
Lef1	ctgagccttgcctctctg	catagtgggactagccctg
Lef1	ggaggtgcatagattcactc	ctcaaccctccctcaagtc
Dkk2	gaggaacacacgtagtcta	acagagggatagagactgag
3722359	acagctgggacatgctatca	tttgggtgctattcctcc
Scye1	tgggaagtgtctggaaag	actggagagatagcatggga
Npnt	taagccatgtctatgtagc	gaatctgagttggtctcag
	aggagaagcaccatgttct	ccacgtcctctatccag
	ccagcttctcagctcatgag	cctcttccgatctctgaaag

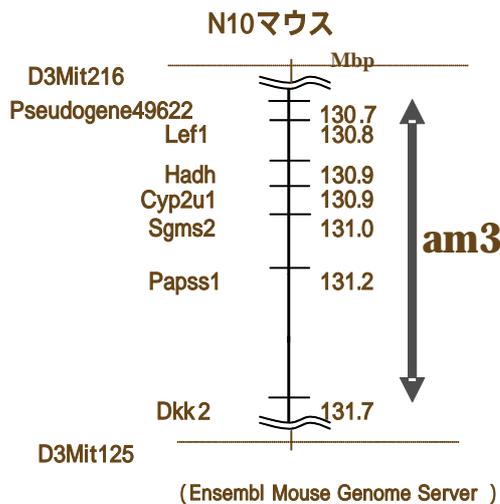


図2 am3の候補遺伝子

表2 N10マウス第三臼歯欠如の上下顎, 左右側の比較

	N10マウス(N10a + N10b)
第三臼歯欠如歯数	56 / 196
上顎:下顎	8 : 48
右側:左側	25 : 31

(2) 候補遺伝子の変異解析

EL マウスに生じる第三臼歯欠如の原因である am3 の候補となった Lef1, Hadh, Cyp2u1, Sgms2, Papss1 の 5 遺伝子に遺伝子変異があるかどうかを検索した。表 3 ~ 5 に示すプライマーを用いて行った。その結果、Lef1, Cyp2u1, Sgms2, Papss1 ではエクソン配列は

コントロールと完全に一致し、遺伝子変異はなかった。Hadh のエクソン 4 に一塩基変異を認められたが、アミノ酸に変化のない変異であった(図3)。この結果より、EL マウスに生じる第三臼歯欠如は、これら 5 遺伝子のエクソン内の変異が原因ではないことが明らかとなった。また、このことより遺伝子調節領域あるいはイントロンの多型が原因である可能性が示唆された。

表3 Lef1のPCRプライマー

Gene	Exon	Forward(F) Reverse(R)	プライマーシーケンス (5'-3')
Lef1	1	F R	ctcagtctccaactccccca tattcccacccagcccgcga
	2	F R	gaattaacagcagaccctc ggttccaccctacfaaacag
	3	F R	ctgggctgtcttagcagcaga tgcttgggagcagtccttg
	4	F R	gaggggactaggaagagtcag faccacaagccatgcgacacg
	5	F R	ctatccccaaaatcaccagtg ctcacagggagcctaactcc
	6	F R	tcctcggtctgtcacaaaac ctctlaagccagccagccca
	7	F R	tgtagctctgcctagggttg ctctgggacagcactctcca
	8	F R	tcagcctcacaggaatctgg gtgggcacacacacacacg
	9	F R	cccatcattcttggagtg tctgagacggacgggagca
	10	F R	ggccaccctgtctgtctgtg gtgacagctacagaaatcgag
	11	F R	gcgagcaggtctacatgtgtg tgggaccatgctgagcggga
	12	F R	gtctaggctagacattgctg ctggagatcgcacagagagc

表4 HadhとCyp2u1のPCRプライマー

Gene	Exon	Forward(F) Reverse(R)	プライマーシーケンス (5'-3')
Hadh	1	F R	gacctgcagctgtgcagga fctgggacactgaagcatgc
	2	F R	atgcttagcccatgagctca gtgaagccacacagacacac
	3	F R	tgttgctctgggtgtgttg agagaggcagggcctactgtc
	4	F R	agtgtgtgtaggtctgcctc aggacaattgtgacaaccga
	5	F R	gcgtagagcctttgattcag cccacttcatagttacctg
	6	F R	gggtaagaaggagaggttc fagaaggcagaagccccttc
	7	F R	ccttgagggttctagaggtg gcaggactttagcaagctfc
	8	F R	tggcctgatgattctgtg tcagagagactgcaaggagag
Cyp2u1	1	F R	aatcggaggcgtgctctg tcgcaactagaaagccacg
	2	F R	gcattctgaactggccctag atggaccaaggaggaggtag
	3	F R	ttcatgtcccgggggttggg acctggacacatgggtgctc
	4	F R	tctgccaagcctcatccag ggfagaacaaccaggacc

表 5 *Sgms2*と*Papss1*のPCRプライマー

Gene	Exon	Forward(F) Reverse(R)	プライマーシーケンス (5'-3')
<i>Sgms2</i>	1	F	gttgatctcgaagtagaagg
	2	R	ggagaaactggagaagctg
	3	R	tggtggtgcaggtcagtc
	4	R	tafggaagactgtgcgaagg
	5	R	acacatcacagcctgtgac cagcatggggatctcatcc agtcgtccgtccatccgtc ggccatcgaagtgggccca ttcacctgctaagtgaccac aaatataaagccgacgtgc
<i>Papss1</i>	1	F	cgaggcgatcactagctgga
	2	R	ggttcccacagccaccacg
	3	R	gcacacctaaaggggtctg
	4	R	tgttcaggctggccctgaa
	5	R	ggtgctgagagtaacgaatg
	6	R	tagcctcaaaacacagggcca
	7	R	acatccatcctggtcagg
	8	R	aggcacatcagatgaacacg
	9	R	ctgaacttcagtcagggtg
	10	R	acacacactctcagtcagg
	11	R	cgaaagccccccttccatca
	12	R	ccaacccaccaccattcatc tcccattacttccagctg ctacccttaacgagagtgac ttcttgagggtgtgcctg attcacaaccagaggagca ccagcttcagaagctgtgg gggcagtggttattatccag tgaccatcaaccaggaagc ggtcagtaggtcagttggtg tcagtgggacagttgacaga accagacaatgtggcgaacc gaagggacaaattcccctg acaaccgcagagaagggtctg

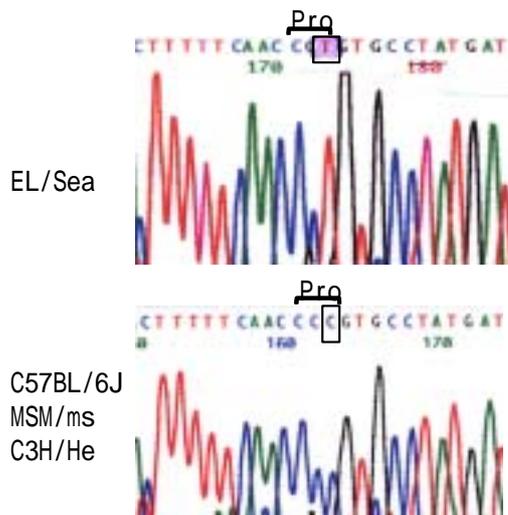


図 3 *Hadh*エクソン 4 に検出した変異

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)

森田涉, 清水武彦, 前田隆秀,
マウス欠如歯原因遺伝子の染色体マッピング、
小児歯科学雑誌、46(5)、511-516、2008、
査読有

森田涉, 姚 睿, 清水武彦, 永田敦子,
能美誠, 韓 娟, 前田隆秀、
コンジェニックマウスを用いた欠如歯
発症に関わる遺伝要因の検討、
小児歯科学雑誌、45(5)、617-622、2007、
査読有

[学会発表](計 2 件)

清水武彦, 姚 睿, 森田涉, 韓 娟,
前田隆秀、
マウス第三臼歯欠如に対する遺伝子変
異解析、
第 46 回 日本小児歯科学会大会、
2008 年 6 月 12 日、
大宮ソニックシティ(埼玉)

森田涉, 清水武彦, 姚 睿, 韓 娟,
前田隆秀、
マウス欠如歯発症に関わる遺伝子の染
色体マッピング、
第 45 回 日本小児歯科学会大会、
2007 年 7 月 27 日、
タワーホール船堀(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 武彦 (SHIMIZU TAKEHIKO)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号: 4 0 3 2 8 7 6 1