

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862011

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた象牙質の石灰化メカニズムの解明

研究課題名(英文) The functional elucidation of vesicles in tooth mineralization

研究代表者

道上 郁美 (Michikami, Ikumi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80589771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯質の石灰化の状態に影響する要因として細胞内での小胞輸送および分泌に着目し、小胞輸送において小胞がターゲットとなる膜に特異的に融合する機構に関与するタンパク質として知られているSNARE(Soluble NSF Attachment protein Receptor)タンパク質の1つであるSnap23がエナメル芽細胞に特異的に発現することを明らかにした。このことから、エナメル芽細胞特異的にSnap23を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行った結果、同腹のコントロールマウスと比較し、第一臼歯におけるエナメル質の形成量が少ない傾向がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on membrane trafficking system as a factor that affects calcification of teeth, and the identification of genes related to the vesicular transport in the tooth-forming cells.

The SNARE (Soluble NSF Attachment protein Receptor) proteins are involved in membrane vesicle fusion. We identified Snap23, one of the SNARE family, expression in tooth by qRT-PCR. In order to confirm the expression and localization of Snap23, we performed sectional in situ hybridization on a murine tooth germ. In situ analysis showed that the specific expression of Snap23 in ameloblast. Therefore, we generated the conditional knock-out mice lacking the Snap23 specifically in ameloblast, and analyzed the phenotype of the mice for the purpose of elucidating the mechanism of calcification of teeth. As a result of the micro-CT analysis, the formation of enamel of S23fl/fl; K14-Cre mice in the first molar was less than that of the control littermates.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯の石灰化 小胞輸送 SNARE

1. 研究開始当初の背景

小児歯科領域では歯の形成異常を主訴とする患者も多い。その代表的なものとして遺伝性象牙質形成不全症やエナメル質形成不全症があげられる。これらは遺伝性疾患であるため、責任遺伝子やその変異部位の同定などが進んでいる。しかし、明白な家族歴や基礎疾患がないにもかかわらず、う蝕の急速な進行や著しい咬耗、歯の破折を示す患者がいる。このような臨床的背景から、申請者は単に基質タンパク質の質的または量的な異常ではない、いまだ明らかにされていない石灰化異常の原因があるのではないかと考えた。

歯における硬組織の石灰化については、例えば、象牙芽細胞内の象牙芽細胞突起への輸送についても、細胞外への分泌についても詳細な分子メカニズムは不明である。また、エナメル芽細胞における基質タンパク質についても、細胞表面や細胞外、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームに輸送されるタンパク質は、まず小胞体に輸送される。さらに、細胞内のタンパク質が小胞体からさらに移動する場合や、細胞内小器官の間の移動は、輸送小胞によって行われる (Rothman JE, 1994 Nature)。このため、小胞輸送およびその分泌が、歯質の石灰化の状態に影響することが考えられるが、その関係についての研究は全くされていない。

そこで、本研究において着目したのが、SNARE(Soluble NSF Attachment protein Receptor)タンパク質である。SNARE タンパク質は神経伝達物質の分泌の中心的役割を果たしており、多様な細胞の膜系の融合を触媒していると考えられている。また、小胞輸送において、小胞がターゲットとなる細胞内小器官や細胞形質膜に融合する機構に関与していることが知られている。SNARE ファミリーは、動物細胞では少なくとも 36 種類の遺伝子から成り、輸送小胞には v-SNARE、ターゲットとなる細胞形質膜・細胞小器官には t-SNARE が存在し、SNARE タンパク質は輸送小胞が標的膜に向かうのを助けている (図 1)。

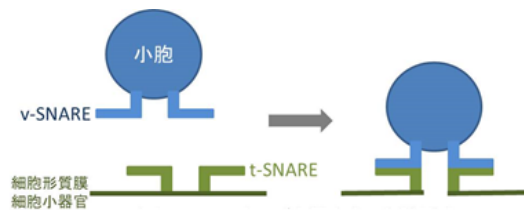


図 1 SNARE タンパク質を介した膜融合

SNARE タンパク質の神経系での解析は精力的にすすめられており (Südhof TC et al., 1993 Cell ; Söllner T et al., 1993 Cell) SNARE タンパク質のノックアウトマウスでは学習機能に障害が生じることがすでに明らかにされている (Ferguson GD et al., 2000 Proc Natl Acad Sci U S A)。しかし、これまでに硬組織形成に関連する報告はなく、骨芽

細胞において、SNARE タンパク質が、グルタミン分泌および細胞間接触・遊走に参与していることが示されているのみである (Bhangu PS. et al., 2001 Bone)。

2. 研究の目的

小胞輸送およびその分泌が、歯質の石灰化の状態に影響しているのではないかと考え、歯質形成細胞における小胞輸送および分泌に関連する遺伝子の同定と、歯質特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作製と表現型解析により、歯の石灰化メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ターゲットとなる SNARE 遺伝子の同定

歯と同様に硬組織系の細胞株である MC3T3-E1 細胞における各種 SNARE 遺伝子の発現を qRT-PCR にて確認した後、発現の高かった Snap23 遺伝子の各組織での発現を確認した。

(2) Cre-loxP システムを用いた細胞特異的に SNARE 遺伝子を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスの作製

シナプス小胞と神経細胞形質膜を融合する SNARE タンパク質の研究は進んでおり、SNARE タンパク質ノックアウトマウスが作製されてはいるが、その多くが胎生致死や出生直後死となるため、歯をはじめとした硬組織についての解析は進んでいない。

そこで、本研究では、歯質形成細胞特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。細胞特異的に SNARE タンパク質を欠損させるためのコンディショナルノックアウトマウスの作製には、ターゲットとなる遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ flox マウスと、細胞特異的に遺伝子を欠損させるために、プロモーターを Cre に連結した Cre 発現マウスの 2 系統を作製し、それらを交配させることにより、コンディショナルノックアウトマウスを得た (図 2)。

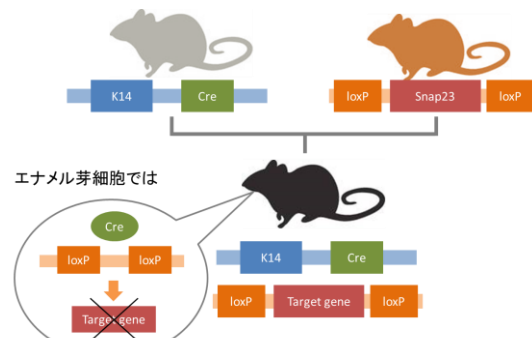


図 2 コンディショナルノックアウトマウスの作製

(3) コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析

換えが確認された ES 細胞を胚盤胞へ移植し、キメラマウスを得た。キメラマウスの交配により得たホモマウスを flox マウスとして用いた。遺伝子型の同定は、マウスの尾より抽出したゲノム DNA を用いて Southern blotting 法 (図 7) および PCR 法により判定した。上記の方法により得られた Cre 発現マウスと flox マウスを交配させることによりコンディショナルノックアウトマウスを得た。

道上 郁美 (Ikumi Michikami)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：80589771

(3) コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析

以上によって得られた 3 日齢コンディショナルノックアウトマウス ($S23^{fl/fl}$; K14-Cre) と同腹のコントロールマウス ($S23^{fl/+}$; WT) の第一臼歯について、マイクロ CT 解析を行った結果、コンディショナルノックアウトマウスにおいて、石灰化量の減少が認められた (図 8)。

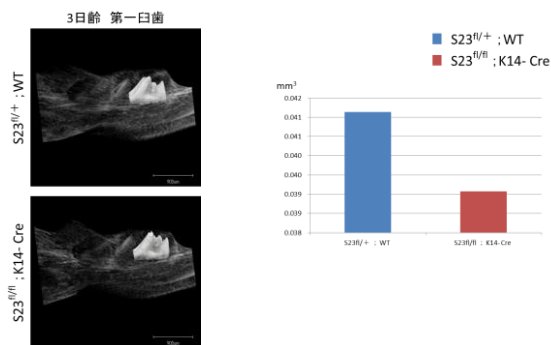


図 8 マイクロ CT による石灰化解析

これらの結果から、Snap23 がエナメル質の石灰化に関与することが示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

道上郁美、大川玲奈、野村良太、仲野和彦
臼歯部交叉咬合を伴う Beckwith-Wiedemann
症候群患児の長期管理
第 34 回 日本小児歯科学会近畿地方会大会・
総会
大阪国際交流センター (大阪)
2015 年 10 月 25 日

Ikumi Michikami, Shinji Kawai, Satoshi
Wakisaka

The functional elucidation of vesicles in
tooth mineralization
International Symposium 2015 Oral and
Craniofacial Development and Diseases
Suita, Japan
December/10. 11/2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者