

氏名	おい かわ あい 及 川 愛
学位の種類	博士 (歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第283号
学位授与の日付	平成24年3月9日
学位論文題目	エナメル質の横紋形成メカニズムの解明

論文内容の要旨

I 研究目的

歯は、骨などと異なり組織の改造現象が生じないため、生体の代謝変化が成長線として記録される。エナメル質の基本構造をなすエナメル小柱には横紋と呼ばれる周期的な構造物が観察される。これは概日リズムを刻んだ成長線のひとつとして知られている。Boyde はトームス突起が周期的に形態を変化させるために生じたとする仮説を提唱し、Simmer らはエナメル芽細胞によるエナメル基質タンパクの分泌の概日リズムにより形成されると考えている。そこで我々はエナメルタンパクの95%を占めるアメロゲニンの発現に周期性があるかを検討し、さらにその周期性の分子制御機構を解明することを目的に本研究を計画した。

II 研究方法

1. フィルムトランスファー法で生後5日齢 ddY マウス切歯無固定非脱灰凍結切片を作製した。抗アメロゲニン抗体と標識2次抗体 Alexa Fluor 488 で免疫染色を行い、エナメル基質を蛍光顕微鏡で観察した。
2. アメロゲニンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだコンストラクト (pGL3-1730-luc) をラットエナメル芽細胞株 HAT7 に遺伝子導入し、アメロゲニンの転写活性を経時的に観察した。細胞は10%血清入り DMEM/F-12 培地で培養して Lipofectamine LTX で遺伝子導入し、24時間後に 0.1mM Forskolin で細胞を同期させた。蛍光顕微鏡 OLYMPUS LV200 では単一細胞の発光の変化を高感度 CCD カメラで撮影し、その撮影データをもとに MetaMorph で発光量を定量した。
3. Fucci の発現ベクターを pGL3-1730-luc と同時に遺伝子導入して発光と蛍光の変化を計測した。
4. プロモーター領域の Deletion-mutant (pGL3-464, -74, 48-luc) を遺伝子導入して発光の変化を計測した。
5. Msx2 の発現ベクターを pGL3-1730-luc と同時に遺伝子導入して発光の変化を計測した。
6. 生後0日齢 Msx2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの切歯切片を通常に従い作製し、トルイジンブルーで染色して光学顕微鏡で観察した。

III 研究成績

1. 基質形成時のアメロゲニンタンパクの免疫染色を行うと、エナメル基質には横紋に類似した周期的な染色パターンが観察された。
2. pGL3-1730-luc を導入した個々の細胞を観察すると、 22.8 ± 3.35 時間 (n=5) の周期でアメロゲニンの転写活性が変動した。
3. Fucci の発現ベクターを同時に遺伝子導入すると、アメロゲニンの転写活性は約24時間周期の変動が認められたが、Fucci orange に変動はなかった。
4. pGL3-48-luc では転写活性を認めず、pGL3-74, -464-luc では pGL3-1730-luc と同様の周期性が観察された。
5. Msx2 の強制発現により、発光の周期が消失した。
6. 野生型マウスのエナメル基質では横紋様の周期的パターンが観察されたが、Msx2 遺伝子欠損マウスでは周期的パターンは観察されずに全体的に強く染色された。

IV 考察及び結論

マウス切歯のエナメル基質を抗アメロゲニン抗体で免疫染色を行うと、その染色パターンが横紋と一致することを見出した。このことからエナメル芽細胞によるアメロゲニンの分泌が概日的に変動しているのではないかと考えた。そこでアメロゲニン転写活性を経時的に観察すると約 24 時間の周期で変動しており、これはアメロゲニンタンパクのリズミカルな発現が mRNA レベルで制御されていることを示唆している。Deletion-mutant を用いた実験から、C/EBP α の結合領域がリズムを主体的に制御する領域であると考えられた。しかし、C/EBP α は恒常的に発現する転写因子で概日リズムを制御している可能性は考えにくい。Msx2 が C/EBP α に結合して転写を抑制することが知られていることから、Msx2 の発現がアメロゲニン転写活性に影響を及ぼすと考えられる。Msx2 の強制発現を行った結果、アメロゲニンの転写リズムが消失した。また Msx2 遺伝子欠損マウスのエナメル基質では横紋様の染色パターンは観察されなかった。

以上より、アメロゲニン発現の概日リズムは Msx2 の発現に依存しており、横紋はアメロゲニンの発現量の周期的変化によって生じた基質形成パターンが、最終的な石灰化のパターンとして描記されたものであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授	佐原 資 謹	(生理学講座 病態生理学分野)
副査 教授	原田 英 光	(解剖学講座 発生生物・再生医学分野)
副査 特任教授	藤村 朗	(解剖学講座 機能形態学分野)

エナメル質の横紋は概日リズムを刻んだ成長線のひとつとして知られているが、形成メカニズムについては様々な説が報告されている。Simmer らはエナメル基質の分泌に周期性があり、その周期性が石灰化したエナメル質に横紋として観察されることを報告している。そこで本研究では、エナメルタンパクの 95% を占めるアメロゲニンの局在を確認するために、非脱灰凍結切片を用いて基質形成期のエナメル基質を抗アメロゲニン抗体で免疫染色を行った。横紋様の染色パターンを示したことから、横紋は基質形成期のアメロゲニンのタンパク量に依存した石灰化パターンであり、アメロゲニンの発現が概日的に変動するのではないかと仮説を立てている。そこでアメロゲニンプロモーターを用いたレポーターアッセイを行い、アメロゲニンの転写活性に周期性があるか、さらにその周期性に関わる分子制御機構を検討した。

アメロゲニンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだコンストラクトをラットエナメル芽細胞株 HAT7 に遺伝子導入してアメロゲニンの転写活性を計測すると、約 24 時間周期で変動していることが認められた。その転写の周期性の制御には Msx2 が関与していると推測し、Msx2 の強制発現を行うと、アメロゲニン転写活性の周期性が消失した。また、Msx2 遺伝子欠損マウスの解析では基質形成による横紋様パターンが見られなかったことを示した。これらの結果から、Msx2 がアメロゲニンの発現周期に影響していることが推測され、さらに横紋はアメロゲニンのタンパク質発現量の周期的変化に依存した石灰化パターンである可能性を示唆した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、研究方法、結果の概要について説明がなされた。エナメル質の形成過程、横紋の構造、Msx2 遺伝子欠損マウスのトルイジンブルー染色像、横紋と概日リズムとの関係について試問した結果、適切な解答が得られた。今後の研究の展望、抱負についても述べられ、研究に対する意欲が感じられた。学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判定した。