

マウス臼歯歯胚発生過程における Na/K-ATPase の局在変化 およびサブユニット構成に関する免疫組織化学的研究

千田 太山

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任: 名和 橙黄雄 教授)

(受付: 1996年8月26日)

(受理: 1996年10月18日)

Abstract: The localization of Na/K-ATPase in the mouse molar enamel organs and the subunit constitution of the enzyme were investigated by means of enzyme histochemistry and immunohistochemistry, using antibodies for the α and β subunits of the anti-rat Na/K-ATPase. Intense enzyme reaction of ouabain-sensitive *p*-nitrophenylphosphatase was specifically localized on the stratum intermedium. Among five different anti-subunits of Na/K-ATPase, only α_2 and β_1 subunits were immunohistochemically localized on the stratum intermedium. When the chronological change in the localization of Na/K-ATPase during tooth development was immunohistochemically assessed using anti- β_1 subunit, the area of positive reaction in stratum intermedium moved from the cuspal region to the cervical region as the enamel matured. After the completion of the enamel matrix maturation, the immunoreaction for the anti- β_1 subunit disappeared from the enamel organ. These results indicate that Na/K-ATPase in the stratum intermedium is composed of α_2 and β_1 subunits, and that the enzyme is significantly involved in the enamel maturation.

Key words: Na/K-ATPase subunit, stratum intermedium, immunohistochemistry, chronological change, mouse

緒 言

一般にエナメル質は二つの大きな段階を経て形成されると言われている。最初は基質形成期と呼ばれ、基質の分泌と同時に石灰化が生じるが、成熟期に入ると急速に水分や蛋白成分が除去され、石灰化度の上昇が起こると言われている¹⁻⁵⁾。これらの現象にともなうエナメル芽細胞の形態変化や組織化学的变化に関する研究は数多くなされてきたが、その他のエナメル器構

成細胞についてはあまり研究が進んでいない。

近年、硬組織に対する組織化学の応用は、石灰化機構の解明や、それにともなう電解質の局在と動態の解明に大きな手がかりが得られるようになってきた。特にエナメル芽細胞における Ca-ATPase⁶⁾ や Ca/Mg-ATPase⁷⁾ の局在は、これらの酵素活性がエナメル質の石灰化に重要な役割を果たしている可能性が示されてきた。一方、エナメル芽細胞や中間層にはアルカリホスファターゼ活性⁸⁻¹⁰⁾のほか H/K-ATPase¹¹⁾

Immunohistochemical studies of the localization and subunit constitution of Na/K-ATPase in developing mouse molar tooth germs.

Tayama CHIDA

(Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

やNa/K-ATPase¹²⁾も存在することが報告されているが、これらの酵素がエナメル質形成に及ぼす影響についてはいまだ十分に解明されていない。

従来からNa/K-ATPase活性の証明はOuabain感受性*p*-nitrophenylphosphatase活性の検出によって代用されてきた¹³⁾。しかし、この酵素の真の局在は免疫組織化学によって確認される必要がある。また、Na/K-ATPaseの歯胚における役割を明らかにするには、その詳細な局在と、経時的局在変化が明らかにされる必要があると考えられる。さらにナトリウムポンプ作用をもつとされるNa/K-ATPaseにはサブユニット構成の異なるいくつかのアイソザイムがあり、アイソザイムパターンには臓器特異性があるといわれている¹⁴⁻¹⁶⁾。したがって、歯胚におけるNa/K-ATPaseのアイソザイムパターンを解明することも有意義であると思われる。以上の観点から、本研究では、歯胚におけるNa/K-ATPaseの局在を酵素組織化学と免疫組織化学の両面から検討するとともに、同酵素のサブユニット構成と歯胚発生過程における経時的局在変化を免疫組織化学的に検索した。

材料および方法

1. 実験材料

生後8週齢の雌雄ddY系マウスを動物舎にて一定の環境下(温度23°C±1°C,湿度55%±5%)で飼育、繁殖させた。飼育期間中、動物には飼育用固形飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)と水を自由に摂取させた。繁殖には朝9時から正午まで3時間交配させ、膣栓を確認した時点を妊娠0日とした。実験には生後2日から17日齢のマウスを使用し、観察には主として下顎第一臼歯を使用した。

2. 免疫組織化学

歯胚発生過程におけるNa/K-ATPaseの免疫組織化学的検索にあたり、48匹の生後マウスを用いた。生後2日から8日齢のマウス(21匹)はケタミン(三共ゾーキ株式会社)の腹腔

内投与(30 mg/kg)により麻酔した後に断頭し、下顎骨を摘出後、直ちに10%中性緩衝ホルマリンで14日間浸漬固定した。生後9日から17日齢のマウス(27匹)は同様の麻酔の後に左心室より10%中性緩衝ホルマリンを灌流した後、下顎骨を摘出し、さらに14日間、同じ固定液で浸漬固定を行った。

固定終了後、各標本はPlank-Rychlo液で3日から4日間脱灰後、通法にしたがってパラフィン包埋した。4 μmの前頭断および矢状断切片を作成し、シラン処理を施したスライドガラスに貼付した。切片は通法に従い、脱パラフィンの後、0.3% H₂O₂を含むメタノール液に30分間浸漬して内在性パーオキシダーゼを阻止した後、0.01 Mリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、免疫染色に供した。

免疫染色はVectastain Elite kitを用いたABC-パーオキシダーゼ法により行い、一次抗体として抗ラットNa/K-ATPase α₁, α₂, α₃, β₁, β₂(UBI社)の各サブユニット特異性抗体を使用した。αサブユニットは各々200倍、βサブユニットは各々300倍に希釈して用い、いずれも37°C 2時間反応させた。αサブユニットのエピトープは細胞膜の内側に、βサブユニットのエピトープは外側にある¹⁰⁾ことから、αサブユニットの反応の際には事前に切片を0.2% Triton X (PBS溶液)で30分間処理した。免疫反応後の切片はDiaminobenzidine (DAB)反応により発色した後、切片はヘマトキシリンで核染色を施し、通法に従い脱水、封入し、光学顕微鏡で観察した。

対照染色には一次抗体の代わりに300倍に希釈した正常ウサギ血清および市販のラット脳ミクロゾーム調整物(Na/K-ATPase含有, Upstate Biotechnology, Inc.)で吸着した希釈抗体を使用した。

3. 酵素組織化学

生後7日齢のマウス(3匹)をケタミン(30 mg/kg)腹腔内投与により麻酔した後に、左心室より0.1 Mカコジル酸緩衝2%パラホルムアルデヒド+0.5%グルタルアルデヒド混合液

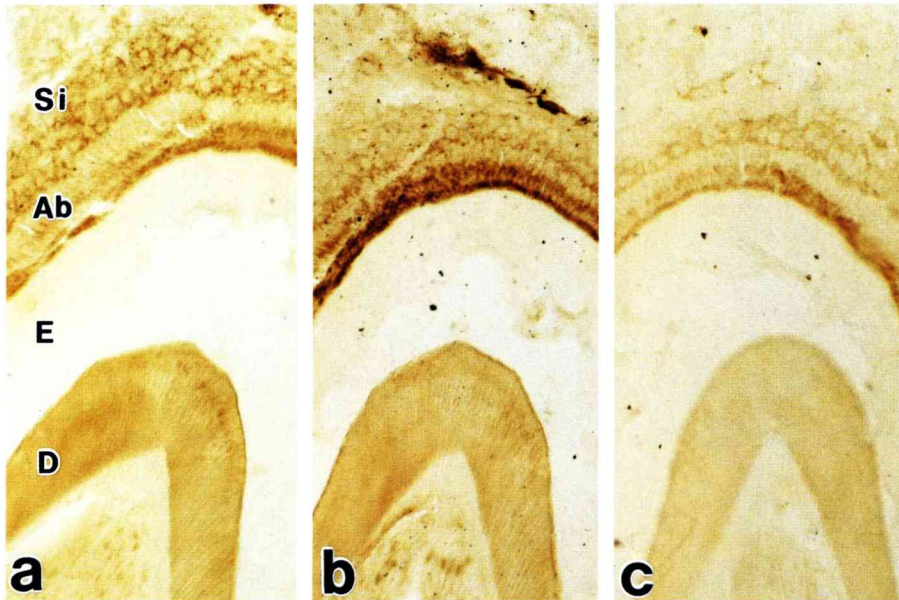


Fig.1. Enzyme histochemistry of Na/K-ATPase in a molar tooth germ from a 7-day-old mouse.

- a : Enzyme reaction after incubation in the normal substrate medium. A positive reaction is localized on the stratum intermedium as well as on the ameloblasts.
 - b : A negative control for Na/K-ATPase using NaOH in the buffer solution instead of KOH. Reactivity of the stratum intermedium is substantially reduced in this control, though the proximal ends of the ameloblast still display an intense positive reaction.
 - c : Control reaction using substrate medium containing ouabain. The reaction products on the stratum intermedium have disappeared completely, but a weakly positive reaction is still seen on the ameloblast layer.
- Si : stratum intermedium, Ab : ameloblast,
E : enamel, D : dentin.

(pH 7.4) の灌流固定を行った。摘出した下顎骨は同じ固定液で一晩、浸漬固定した後、3% EDTA で4℃ 3週間脱灰後、O.C.T.Compound (Miles Inc.) に封入し液体窒素にて急速凍結し、6 μmの凍結切片を作製した。切片は脱灰操作により失われたマグネシウムを補うため、10 mM 塩化マグネシウム液に1時間浸漬した後、Mayahara ら¹³⁾の方法に従い *p*-nitrophenyl-phosphate magnesium を基質として 37℃ 50分間反応させた。対照染色は、基質を除外した反応液、10 mM Ouabain (73 mg/ 10 ml) を添加した反応液および緩衝液の KOH を NaOH で置き換えた反応液でそれぞれ同様に反応させた。反応後の切片は 0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄し、1% 無水硫化アンモニウム液にて発色

させ、蒸留水で洗浄の後、グリセリンゼリーで封入して光学顕微鏡で観察した。

結 果

1. 生後6日から7日齢マウス下顎第一臼歯歯胚における Na/K-ATPase の局在

生後7日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚における酵素組織化学反応はエナメル芽細胞と中間層に DAB による茶褐色の陽性反応を示したが、エナメル芽細胞に比較して中間層には特に強い陽性反応が認められた (Fig.1a)。これに対し、基質を除外した反応液による対照染色ではいずれの部位にも陽性反応は認められなかった。10 mM Ouabain 添加および緩衝液に NaOH を用いた対照染色では中間層の反応性は著しく抑制

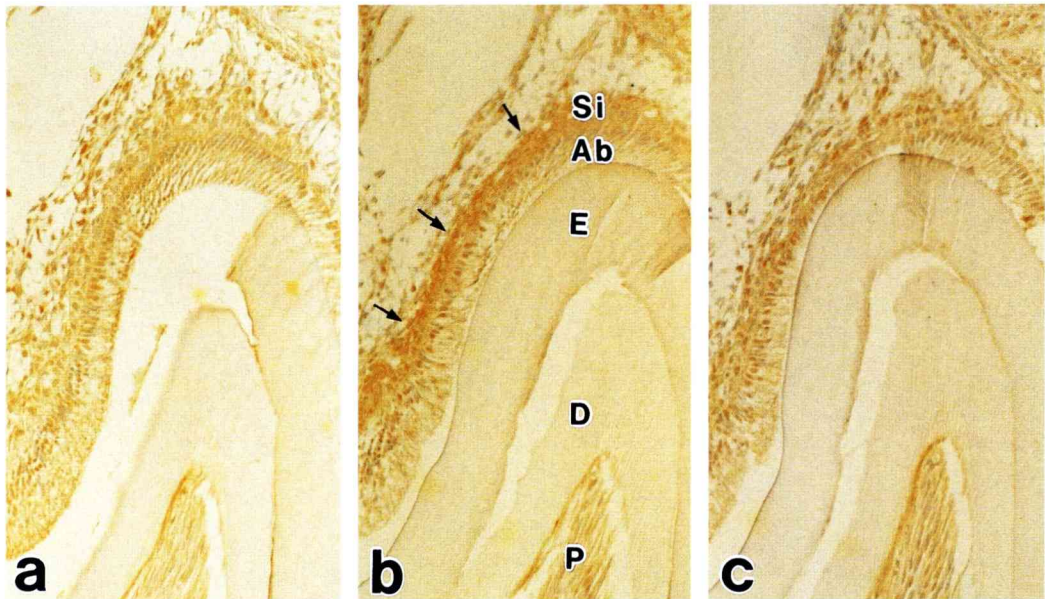


Fig. 2. Immunohistochemical reactions for anti-Na/K-ATPase α subunits in a molar tooth germ from a 6-day-old mouse (a : α_1 subunit, b : α_2 subunit, c : α_3 subunit).

Note that stratum intermedium (arrows) shows the strongest positive reaction for the anti- α_2 subunit.

Si : stratum intermedium, Ab : ameloblast, E : enamel, D : dentin, P : pulp

された。しかし、エナメル芽細胞の陽性反応にはほとんど変化がみられなかった (Fig. 1b,c)。

一方、生後6日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚を5種類のラット Na/K-ATPase サブユニット (α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2) に対する抗体で免疫染色すると、 α_2 と β_1 抗体のみが中間層に特異的な陽性反応を示し、特に β_1 抗体による染色性は鮮明であった。星状網、外エナメル上皮およびエナメル芽細胞にはこれらの抗体による陽性反応が認められなかった (Figs. 2b, 3a)。他のサブユニットはすべて歯胚の全部位において陰性であった (Figs. 2a, c, 3b)。正常ウサギ血清およびラット脳ミクロゾーム抽出液で吸着した抗体を用いた対照染色ではいずれも反応が認められなかった (Fig. 3c, d)。

2. 歯胚発生過程における Na/K-ATPase の局在変化

上記の結果に基づいて、臼歯歯胚の発生各段階における Na/K-ATPase の局在を β_1 サブユニット抗体を用いた免疫組織化学により比較観

察した。生後3日齢以前の歯胚では、咬頭部にすでに少量のエナメル質形成が認められたが、この時期の中間層には未だ β_1 抗体に対する陽性反応はほとんど認められなかった (Fig. 4a)。4日齢になるとエナメル質形成はさらに進み、咬頭部エナメル質には成熟の兆しがみられた。この時期の咬頭部の中間層には β_1 サブユニットに対する陽性反応が認められるようになったが (Fig. 4b)、同じ歯胚の歯頸部中間層は依然として陰性であった。その後8日齢までは、陽性反応部位の拡大が認められ、9日齢になると咬頭から裂溝にかけての広い範囲の中間層に陽性反応が認められるようになった (Fig. 4c)。しかし歯頸部中間層には弱い反応が認められるのみであった。ところが12日齢になると、反応は逆に咬頭部では弱くなり、いまだエナメル質成熟の完了していない歯頸部の中間層に強く出現するようになった (Fig. 4d)。この時期の歯胚には enamel free area が明瞭に観察されるが、この領域では、中間層が不明瞭で、 β_1 サブ

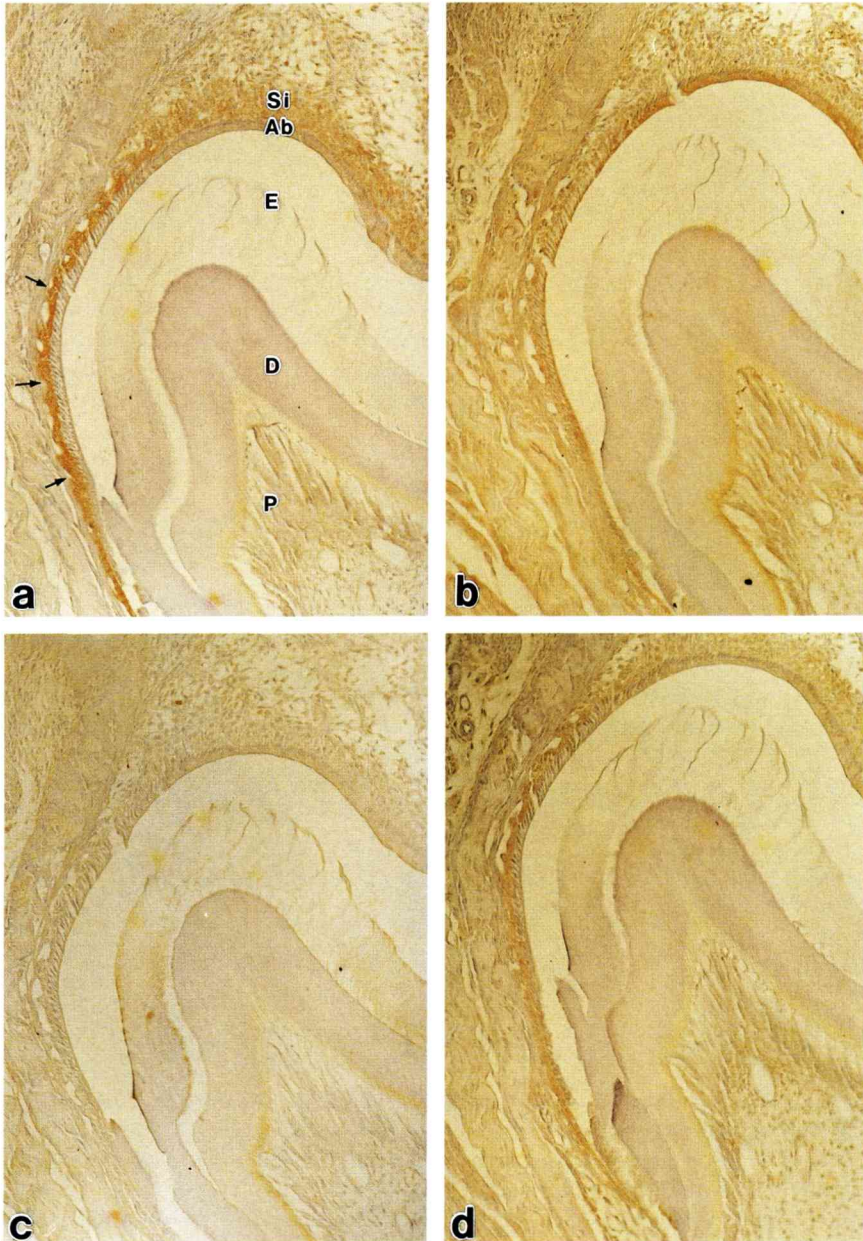


Fig.3. Immunohistochemical reactions for anti-Na/K-ATPase β subunits and control reactions in a molar tooth germ from a 10-day-old mouse.

a : β_1 subunit. Note a strong immuno-positive reaction on the stratum intermedium (arrows).

b : β_2 subunit. No positive reaction is seen on the stratum intermedium.

c : Control staining with normal rabbit serum. No positive reaction is seen on the stratum intermedium.

d : Control staining with anti- β_1 subunit preabsorbed with rat brain microsomal proteins. A positive reaction on the stratum intermedium is clearly diminished from the stratum intermedium in Fig. 3a.

Si : stratum intermedium, Ab : ameloblast, E : enamel, D : dentin, P : pulp

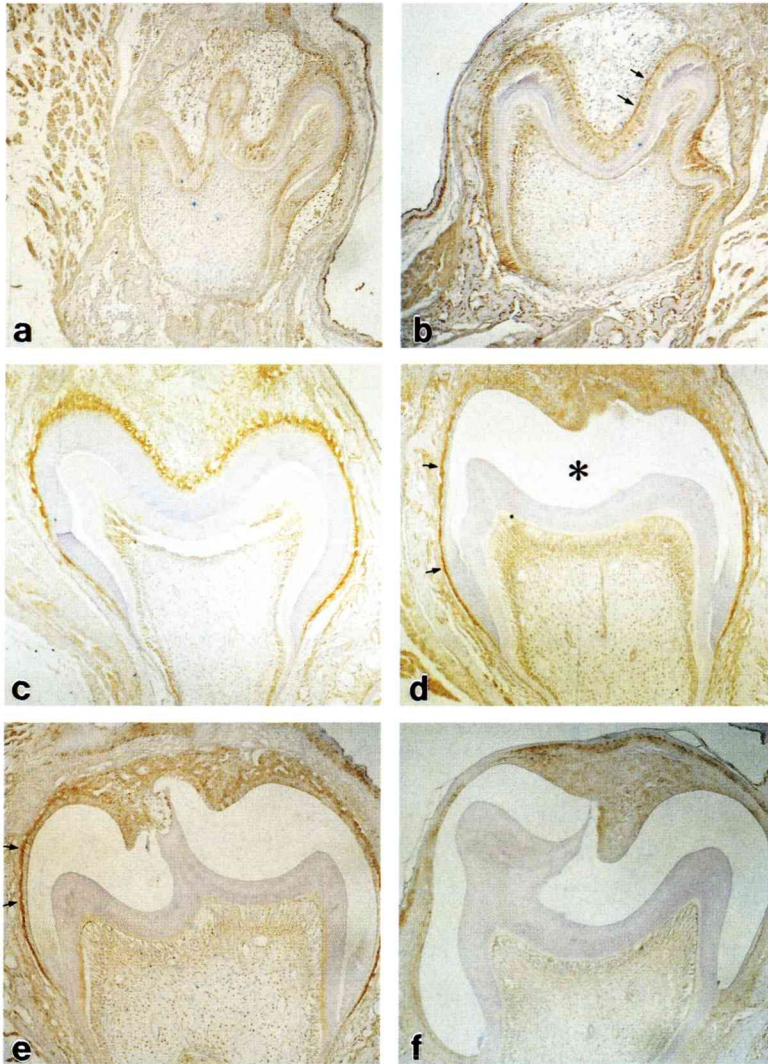


Fig.4. Immunohistochemical reactions for anti-Na/K-ATPase β_1 subunit in developing tooth germs from 3-day-old to 16-day-old mice.

- a : 3-day-old. A small amount of enamel matrix has been formed by this stage. Note that the stratum intermedium shows a negative immunoreaction.
- b : 4-day-old. Initial positive reaction for anti- β_1 subunit appears at this stage on the stratum intermedium of the cuspal region (arrows).
- c : 9-day-old. Note that entire enamel matrix at this stage is still immature and that whole stratum intermedium shows an intensely positive immunoreaction for anti-Na/K-ATPase β_1 subunit.
- d : 12-day-old, e : 14-day-old. At these stages, papillary layers covering mature enamel show a negative immunoreaction for anti- β_1 subunit. By contrast, in the cervicular regions, which still possess immature enamel matrix, an intense reaction for anti- β_1 subunit can still be observed on the papillary layer (arrows). Asterisk shows the space of demineralized enamel.
- f : 16-day-old. Enamel formation has been accomplished by this stage, and no portion of the tooth germ shows a positive immunoreaction for β_1 subunit.

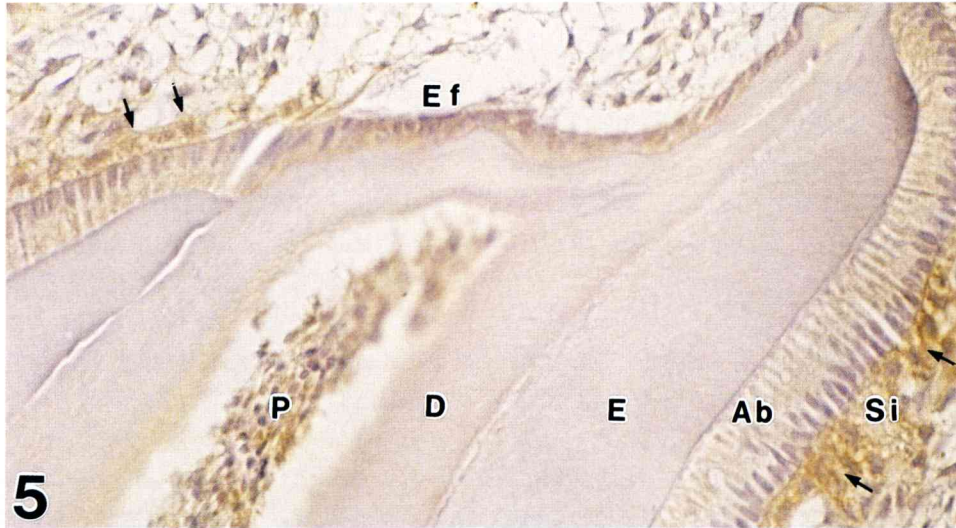


Fig.5. Mouse mandibular molar immunohistochemically stained using anti-Na/K-ATPase β_1 subunit. Enamel free area (Ef) is devoid of the distinctive layer of stratum intermedium and no positive reaction for anti- β_1 subunit can be seen. Arrows indicate papillary layer positively stained by anti- β_1 subunit.
 Ef : enamel free area, Si : stratum intermedium, Ab : ameloblast, E : enamel, D : dentin, P : pulp

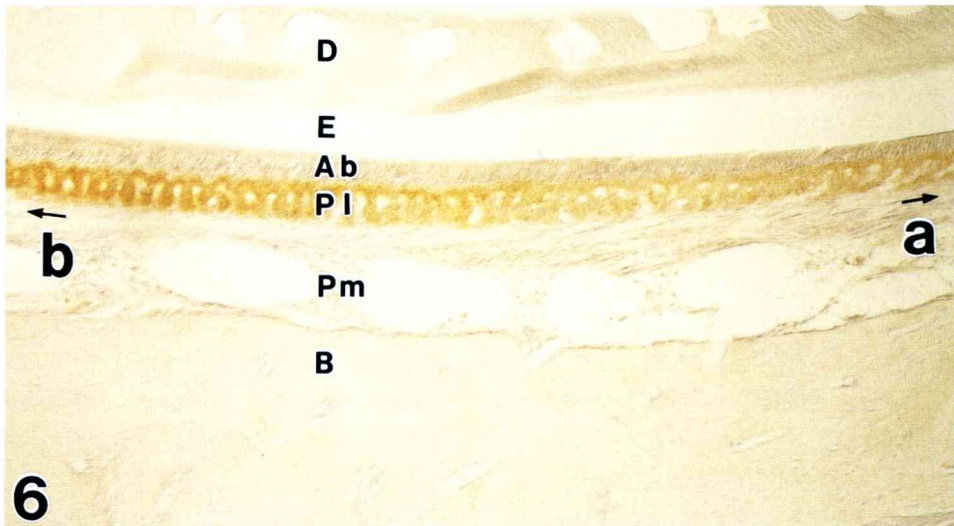


Fig.6. Immunohistochemical reaction for Na/K-ATPase β_1 subunit in a 17-day-old mouse incisor. Note that intensity of the immunoreaction for β_1 subunit in the papillary layer gradually decreases from the basal (b) portion to the apical (a) portion of the tooth.
 D : dentin, E : enamel, Ab : ameloblast,
 Pl : papillary layer, Pm : periodontal membrane, B : alveolar bone.

ユニット抗体に対する免疫反応も全く欠如していた (Fig. 5)。14 日齢になると、石灰化の進んだ咬頭から裂溝にかけての中間層 (乳頭層) の反応は一層不明瞭となり、歯頸側に陽性反応を残すのみとなった (Fig. 4e)。さらに、萌出時期の 16 日齢以降においては咬頭部、歯頸部いずれにも反応はほとんど認められなくなった (Fig. 4f)。

中間層細胞における β_1 サブユニットの発現がエナメル質の成熟と密接に関係していると考えられたので、17 日齢ラットの切歯矢状断に対する β_1 抗体の反応を試みた。その結果、根基部から中央部にかけての中間層ないし乳頭層には明瞭な β_1 抗体に対する陽性反応が認められたが、石灰化の進んだ先端部に向かうにつれて反応性が徐々に減弱し消失する様子が観察された (Fig. 6)。

考 察

本研究において著者は酵素組織化学と免疫組織化学の両面から歯胚中間層に Na/K-ATPase が局在することを明らかにした。Garant ら¹²⁾ は先にラット歯胚の中間層とエナメル芽細胞に Na/K-ATPase 活性があることを電顕酵素組織化学によって証明した。今回の著者の観察でも *p*-nitrophenylphosphate 活性を示す反応が中間層とエナメル芽細胞の両方に認められたが、エナメル芽細胞の反応は Ouabain 存在下でも、K イオン欠如下でも出現した。これに対し、中間層の反応はこれらの条件下では著しく低下した。さらに著者の免疫組織化学的研究では強い Na/K-ATPase サブユニットタンパクの存在を示す強い免疫反応が中間層に限局して観察された。これらの結果を考え合わせると、歯胚においては Na/K-ATPase は主に中間層に局在するのではないかと考えられる。しかし、今回著者は免疫電顕を試みなかったため、エナメル芽細胞に微量の Na/K-ATPase が存在する可能性については否定できない。

Na/K-ATPase は 2 分子の α サブユニットと 2 分子の β サブユニットからなる 4 量体であ

り^{16,17)}、各サブユニットには異なるアイソフォームが存在することが判明している¹⁰⁾。 α サブユニットには α_1 、 α_2 、 α_3 の 3 種類のアイソフォーム、 β サブユニットには β_1 、 β_2 の 2 種類のアイソフォームが存在する¹⁵⁾。これらのアイソフォームの存在は臓器によって異なることが知られており、 α_1 は主として腎臓に¹⁸⁾、 α_1 と α_2 は脳¹⁸⁾、心臓¹⁹⁾、脂肪組織、骨格筋²⁰⁾ に存在することが報告されている。また、最近 Tachibana ら²¹⁾ は知覚神経終末に局在する Na/K-ATPase は α_3 と β_1 サブユニットからなることを報告している。このように、Na/K-ATPase にはサブユニット構成の異なるアイソザイムがあり臓器特異性がみられることは、この酵素の活性ないしは機能がアイソザイムによって若干異なる可能性を示しているのかも知れない。本研究においては歯胚中間層は α_2 と β_1 サブユニットのみに免疫組織化学的に陽性を示した。このことは、歯胚中間層の Na/K-ATPase が主として α_2 と β_1 サブユニットからなるアイソザイムであることを強く示唆していると思われる。歯胚に分布する Na/K-ATPase のサブユニット構成を明らかにしたのは本研究が初めてである。

本研究では、抗 Na/K-ATPase β_1 サブユニット抗体を用いて臼歯歯胚発生各段階における Na/K-ATPase の局在変化を観察した。その結果、 β_1 サブユニットに対する反応はエナメル質分泌の初期には全く観察されないがエナメル質の成熟が開始する生後 4 日齢頃から咬頭部の中間層に出現し、その反応はエナメル質形成の進行にともなって歯頸側の中間層へと広がって行く傾向がみられた。生後 14 日齢になるとエナメル質の成熟が進んだ咬頭部乳頭層では抗 β_1 サブユニット抗体に対する反応は減弱し、エナメル質の未成熟な歯頸部中間層にのみ強い反応が認められるようになる。エナメル質形成の完了した生後 16 日齢の萌出直前になると、この Na/K-ATPase β_1 サブユニットの免疫反応は歯胚上皮から完全に消失した。常生歯であるラット切歯においてもエナメル質成熟が完了

した切歯先端部では Na/K-ATPase の反応は消失し、エナメル質の成熟が進行中の切歯中間部の中間層ないしは乳頭層細胞に強い陽性反応がみられ、エナメル質が極めて未熟な歯根部では免疫反応が弱いという、臼歯と同様の Na/K-ATPase の分布パターンが観察された。これらの結果は、臼歯歯胚の Na/K-ATPase の中間層ないしは乳頭層における局在変化がエナメル質の成熟と同調して咬頭部から歯頸部へと移行することを示している。

中間層はエナメル芽細胞の近心端に配列する細胞層で、中間層の細胞はエナメル芽細胞に隣接しており、またエナメル基質分泌期後半には乳頭層細胞によって置き換えられる。中間層細胞は多数の良く発達したデスモゾーム、ギャップ結合、密着結合などの細胞間接着装置によって星状網細胞やエナメル芽細胞と互いに結合しており、特に中間層とエナメル芽細胞の間にこれらの結合装置が発達していることから、両者の細胞はエナメル質形成の上で一つの機能的構成単位として作用すると考えられてきた²²⁻²⁴⁾。

実際、分泌期のエナメル芽細胞やこの細胞と隣接する中間層細胞にはアルカリホスファターゼ⁸⁻¹⁰⁾の他 Ca-ATPase⁶⁾ や Ca/Mg-ATPase⁷⁾ など複数の酵素が存在し、中間層はエナメル芽細胞と協調して基質の形成や石灰化に関与していると考えられている。

エナメル質の成熟はエナメル基質への無機質の添加²⁵⁾とエナメル質からの有機質の脱却の二段階からなるといわれている²⁶⁾。本研究において示された中間層の Na/K-ATPase タンパクの局在パターンはこの酵素がエナメル基質形成ではなくむしろエナメル質成熟に密接に関わっていることを示唆していると思われるが、現時点では石灰化、基質脱却のいずれに作用しているのかは不明である。しかし、Na/K-ATPase はナトリウムポンプとして機能し、細胞内から細胞外へのナトリウムイオンの排出によるとされているので^{17,27)}、中間層領域にイオンの濃度勾配を作ることにより、エナメル質側へのカルシウム輸送を助けているという可能性が考えられ

るかも知れない。今後、この酵素に対する阻害剤の歯胚発生に及ぼす影響などを調べることに より、この酵素の意義がさらに明らかにされる必要があると思われる。

結 論

マウスの歯胚発生過程における Na/K-ATPase の局在とサブユニット構成を免疫組織化学的ならびに酵素組織化学的に検索した結果、次のような結論が得られた。

- 1) Na/K-ATPase は中間層および乳頭層に局限することが示唆された。
- 2) 中間層における Na/K-ATPase は α_2 と β_1 により構成されることが免疫組織化学的に示された。
- 3) Na/K-ATPase の免疫反応局在は歯胚の発生段階にともなって変化し、生後 4 日齢に咬頭部から始まり、その後徐々に歯頸部側に移行しエナメル質形成とともに消失した。
- 4) これらの結果から、中間層における Na/K-ATPase はエナメル質の成熟過程に積極的に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師、岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授ならびに立花民子助教授に深甚なる謝意を表します。また、同口腔解剖学第二講座石関清人講師に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に際し数々の御教示、御助言を戴いた同口腔解剖学第二講座山本仁助手、藤原尚樹助手に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第 37 回歯科基礎医学会学術大会、総会 (1995 年 9 月 23 日、東京) において発表した。

文 献

- 1) Raith, E. J. : The ultrastructure of ameloblasts during early stages of maturation of enamel. *J. Cell Biol.* 18 : 691-696, 1963.
- 2) Kallenbach, E. : Fine structure of rat incisor ameloblasts in transition between enamel secretion and maturation stages. *Tissue Cell.* 6 : 173-190, 1974.
- 3) Kallenbach, E. : Fine structure of rat incisor ameloblasts during enamel maturation. *J. Ultrastruct. Res.* 22 : 90-119, 1968.
- 4) Kallenbach, E. : Fine structure of rat incisor ameloblasts during late pigmentation and regression stages. *J. Ultrastruct. Res.* 30 : 38-63, 1970.
- 5) Elwood, W. K., and Bernstein, M. H. : The ultrastructure of the enamel organ related to enamel formation. *Am. J. Anat.* 122 : 73-93, 1968.
- 6) Sasaki, T., and Garant, P. R. : Mitochondrial migration and Ca-ATPase modulation in secretory ameloblasts of fasted and calcium-loaded rat. *Am. J. Anat.* 179 : 116-130, 1987.
- 7) Sasaki, T., and Garant, P. R. : Ultracytochemical demonstration of ATP-dependent calcium pump in ameloblasts of rat incisor enamel organ. *Calcif. Tissue Int.* 39 : 587-596, 1986.
- 8) Kurahasi, Y., and Yoshiki, S. : Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. *Archs. Oral Biol.* 17 : 155-163, 1972.
- 9) Ten Cate, A. R. : The distribution of alkaline phosphatase in the human tooth germ. *Archs. Oral Biol.* 7 : 195-205, 1962.
- 10) Deporter, D. A., and Ten Cate, A. R. : Fine structural localization of alkaline phosphatase in relation to enamel formation in the mouse molar. *Archs. Oral Biol.* 21 : 7-12, 1976.
- 11) Sasaki, T., Tadokoro, K., Yanagisawa, T., Higashi, S., and Garant, P. R. : H⁺-K⁺-ATPase activity in the rat incisor enamel organ during enamel formation. *Anat. Rec.* 221 : 823-833, 1988.
- 12) Garant, P. R., Sasaki, T., and Colflesh, P. E. : Na-K-ATPase in the enamel organ : Localization and possible roles in enamel maturation. *Adv. Dent. Res.* 1 : 267-275, 1987.
- 13) Mayahara, H., Fujimoto, K., Ando, T., and Ogawa, K. : A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent *p*-nitrophenyl-phosphatase activity. *Histochemistry* 67 : 125-138, 1980.
- 14) Shyjan, A. W., and Lobinson, R. : Antisera specific for the α_1 , α_2 , α_3 and β subunit of the Na, K-ATPase : Differential expression of α and β subunit in rat tissue membranes. *Biochemistry* 28 : 4531-4535, 1989.
- 15) Martin-Vasallo, P., Dackowski, W., Emanuel, J. R., and Levenson, R. : Identification of a putative isoform of the Na, K-ATPase β subunit. *J. Biol. Chem.* 264 : 4613-4618, 1989.
- 16) Sweadner, K. J. : Isozymes of the Na/K-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 988 : 185-220, 1989.
- 17) Skou, J. C. : Methods in Enzymology (Overview) : The Na, K-Pump. Academic Press, Volume 156 : 1-25, 1988.
- 18) Sweadner, K. J. : Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* 254 : 6060-6067, 1979.
- 19) Sweadner, K. J., and Farshi, S. K. : Rat cardiac ventricle has two Na⁺, K⁺-ATPases with different affinities for ouabain : Developmental changes in immunologically different catalytic subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 8404-8407, 1987.
- 20) Lytton, J., Lin, J. C., and Guidotti, G. : Identification of two molecular forms of (Na⁺, K⁺)-ATPase in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 260 : 1174-1184, 1985.
- 21) Tachibana, T., Chida, T., and Nawa, T. : Localization and subunit composition of Na⁺/K⁺-ATPase (Na⁺ pump) in peripheral sensory nerve endings : An enzyme histochemical and immunohistochemical study. *Prim. Sensory Neuron.* 3 : 209-220, 1996.
- 22) Pannese, E. : Ultrastructure of the enamel organ. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 3 : 169-218, 1964.
- 23) Garant, P. R. : The demonstration of complex gap junctions between the cells of the enamel organ with lanthanum nitrate. *J. Ultrastruct. Res.* 40 : 333-348, 1972.
- 24) Matthiessen, M. E., and Rømer, P. : Ultrastructure of the human enamel organ. I. External enamel epithelium, stellate reticulum, and stratum intermedium. *Cell Tissue Res.* 205 : 361-370, 1980.
- 25) Reith, E. J. : A model for transcellular transport of calcium based on membrane fluidity and movement of calcium carriers within the more fluid microdomains of the plasma membrane. *Calcif. Tissue Int.* 35 : 129-134, 1983.
- 26) Bluman, G., and Merzel, J. : Autoradiographic study with [³⁵S]-sodium sulphate of less of sulphated glycosaminoglycans during amelogenesis in the guinea pig. *Archs. Oral Biol.* 21 : 513-521, 1976.
- 27) Stekhoven, F. S., and Bonting, S. L. : Transport adenosine triphosphatases : Properties and function. *Physiol. Rev.* 61 : 1-76, 1981.