The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ワニにおけるアメロブラスチン遺伝子の同定とそのタンパク分布に関する研究
Author(s)	小畑, 充彦
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/45162
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【31】

氏　　名	小畑充彦（こばたみつひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　18602　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	**ワニにおけるアメロブラスチン遺伝子の同定とそのタンパク分布に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　大嶋　隆 （副査） 教　授　森崎市治郎　助教授　原田　英光　講　師　豊澤　悟

論文内容の要旨

歯のエナメル基質タンパクの一つであるアメロブラスチン（AMBN）は、哺乳類のエナメル質形成期のエナメル小柱鞘に特異的に分布することが報告され、エナメル小柱構造の構築との関係が示唆されているが、その機能は明らかではない。これまでにクローニングされた数種の哺乳類の *AMBN* 遺伝子間に高い相同性が認められ、高度に保存された遺伝子であると考えられることから、エナメル質に小柱構造の認められない爬虫類にも *AMBN* 遺伝子の存在が予測された。本研究では、爬虫類の代表としてメガネカイマンワニ（ワニ）の *AMBN* 遺伝子のクローニングを試み、その塩基配列および遺伝子構造を決定し、既知の哺乳類 *AMBN* 遺伝子と比較・検討した。また小柱構造を持たないエナメル質を有するワニの歯における AMBN タンパク発現の意義を検討するため、ワニ AMBN に特異的に反応する抗体を作製し、ワニのエナメル質形成期における AMBN タンパクの分布について免疫組織化学的に観察した。

【材料と方法】

〈*AMBN* 遺伝子の塩基配列および遺伝子構造の決定〉

ワニ顎骨からトータル RNA および筋肉組織よりゲノム DNA を抽出した。トータル RNA を用いてヒト *AMBN* 特異的プライマーにより reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) を行うことでワニ *AMBN* cDNA 断片を得た。これをもとに 5′ rapid amplification of cDNA ends（5′ RACE）および 3′ RACE を行い、得られたクローンをシークエンスすることにより、ワニ *AMBN* cDNA の全塩基配列を決定した。遺伝子構造はワニのゲノム DNA をワニ *AMBN* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR およびシークエンスし、cDNA の配列と比較することにより明らかにした。

〈塩基配列のデータ解析〉

得られた塩基配列について分子生物学的および分子進化学的解析を行った。

〈*AMBN* 遺伝子のゲノム上におけるコピー数の検討〉

ワニのゲノム DNA に対して、ワニ *AMBN* cDNA をプローブとしてサザンブロット解析を行った。

〈*AMBN* 遺伝子が発現する組織の検討〉

ワニの顎骨および数種の他組織より得たトータル RNA をワニ *AMBN* 遺伝子特異的なプライマーにて RT-PCR を行うことにより検討した。

〈ワニ歯胚におけるAMBNの局在に関する免疫組織学的検討〉

(1) 抗ワニAMBNペプチド抗体の作製：ワニAMBNの推定アミノ酸配列をもとに、そのN末およびC末領域と配列の一致した合成ペプチドをウサギに免疫し、2種類の抗ワニAMBNペプチド抗体（それぞれ抗A1抗体、抗A4抗体）を作製した。また、リコンビナントワニAMBNを作製し、ウェスタンブロット分析することでこれら抗体の評価を行った。

(2) 組織切片の作製：ワニを灌流固定した後、顎骨を脱灰し、続いて通法に従いパラフィン包埋を行った。矢状方向に歯胚を含む下顎骨の3μmの連続切片を作製し、免疫染色に供した。

【結果と考察】

得られたワニ*AMBN*のcDNAは1221塩基、407個の推定アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレームを含んだ全長1909塩基で構成されていた。ワニAMBNの推定アミノ酸構成比率は哺乳類と酷似しており、その配列は哺乳類と39～47%の相同性を示した。推定分子量あるいは予想される等電点も哺乳類のAMBNとほぼ一致していた。特に、N末領域の相同性は極めて高く、この領域には進化において変異に対する負の選択が働いていると推察された。また、5′領域のマルチプルアライメントの結果から哺乳類AMBNの翻訳開始コドンが従来考えられてきた位置より27塩基3′側に存在する可能性が考えられた。

遺伝子構造を調べると、ワニ*AMBN*は11個のエクソンより構成されており、13個のエクソンより構成されるヒト*AMBN*において認められる重複配列（エクソン7、8、9）のうち8、9に相当する配列を認めなかった。ゲノムにおける*AMBN*遺伝子のコピー数を検討したサザンブロット解析の結果からワニ*AMBN*のコピーが一つであることが明らかとなった。また、各組織のトータルRNAを用いて行ったRT-PCRの結果からAMBNは顎骨おそらく歯のみに発現していることが示唆された。

ワニAMBNを認識する2種類の抗体を用いて免疫染色を行った結果、抗A1抗体による免疫反応はエナメル基質全体に均一に認められ、エナメル基質の脱却とともに消失するのに対して、抗A4抗体による免疫反応はエナメル芽細胞遠心位の分泌端に接したエナメル質表層部に限局し、エナメル基質が脱却される成熟期後期に至っても消失しなかった。このワニにおける両断片の分布は哺乳類と同様のパターンを示しており、ワニにおいても哺乳類と同様にAMBNが分泌後直ちにいくつかの断片に分解され機能を営んでいるタンパクである、との推察を支持するものである。

本研究の結果はAMBNがエナメル小柱構造を有しないワニにおいてもエナメル質の形成に重要な役割を担っているタンパクであり、これまでに推察されているエナメル小柱構造の構築以外の何らかの機能を有する可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、爬虫類（ワニ）においてアメロブラスチン遺伝子の同定を試み、そのタンパク分布について免疫組織学的検討を加えたものである。その結果、エナメル質に小柱構造を有しないワニにもアメロブラスチン遺伝子が存在し、アメロブラスチンペプチドの歯の発生における分布パターンが哺乳類と酷似することを明らかにした。この結果は種の違いを超えてアメロブラスチンがエナメル質形成に重要な役割を担うタンパクであることを示唆した。

以上のことから、本研究は歯の進化に関して重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。