

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学専攻
(口腔分子感染制御学講座)

小畑充彦

要約

歯の起源は、約5億年前に出現した顎も歯もない無顎類の体表の結節（象牙質結節）に由来し、顎と共存的進化することにより捕食器として利用され、脊椎動物に適応放散と繁栄の機会を与えたと考えられている。従って、歯の進化は脊椎動物の進化を考える上で、極めて重要な要素である。またエナメル基質タンパクは歯に特異的であることから、歯の進化を分子レベルで検討するには最も適した分子であると考えられる。

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は、哺乳類の形成期エナメル質における特異的な分布から、エナメル質の構築に深く関与していると考えられる。これまでにクローニングされた数種の哺乳類のアメロブラスチン遺伝子間には高い相同性が認められ、この遺伝子は高度に保存された遺伝子であると考えられることから、爬虫類においてもその存在が予測された。そこで本研究では、爬虫類のメガネカイマンワニ（ワニ）アメロブラスチン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、既知の哺乳類アメロブラスチン遺伝子と比較・検討した。また、ワニアメロブラスチン抗ペプチド抗体を作製し、ワニの歯胚におけるアメロブラスチンの分布を免疫組織化学的に観察した。そして、これを哺乳類と比較することによって形態学的な観点から進化過程におけるアメロブラスチン分布や機能の変遷に関して検討を加えた。

得られたワニアメロブラスチンの 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

成されており、ゲノム上では 11 個のエクソンより構成されていた。推定アミノ酸の構成比率も哺乳類と酷似していた。その配列は哺乳類と 39~47%の相同性を示し、特にN末端領域の相同性が極めて高いという特徴を示した。その他、推定分子量あるいは予想される等電点も哺乳類のアメロブラスチンとほぼ一致していた。また、この遺伝子のゲノム上でのコピー数は一つで、ワニにおいても歯のみに発現している遺伝子であると考えられた。さらに、推定アミノ酸配列をもとにワニアメロブラスチンの N 末端領域、C 末端領域を認識する 2 種類の抗ペプチド抗体（それぞれ抗 A1 抗体、抗 A4 抗体）を作製し、ワニ歯胚におけるアメロブラスチンの局在を免疫染色法で調べた。その結果、抗 A1 抗体への反応は、分泌期から移行期にかけてはエナメル基質全体に認められるものの、基質の石灰化とともに徐々に消失し、エナメル基質成熟期後期には認められなくなった。一方、抗 A4 抗体に対する反応は、エナメル基質分泌期から成熟期後期に至るまで継続してエナメル基質表層に限局して認められた。

本研究の結果はアメロブラスチンが爬虫類の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、哺乳類と爬虫類において共通の機能を有しつつ進化してきた分子である可能性が示唆された。

緒言

脊椎動物の進化はカンブリア後期からデボン紀後期まで栄えた無顎類に端を発し、歯の進化も約 5 億年前に生息していた無顎類である甲皮類の外骨格の表面を覆った象牙質結節に由来すると考えられている (Halstead, 1969)。現在でも軟骨魚類に認められる体表の皮歯はこの象牙質結節の名残りと考えられている。その無顎類から有顎類への進化の過程において、口窩が陥入するとともに体表の皮歯が口腔内に巻き込まれ、その進化したものが歯であると推察されている (Smith と Coates, 1998)。また、口に最も近位な鰓弓骨から進化したと考えられる顎 (Smith と Coates, 1998) は、歯との共存的進化により、捕食器という生存のための必須の器官として利用され、脊椎動物により積極的な活動を促し、その適応放散と繁栄の礎を与えたと考えられている。このような“顎歯”は、エナメル質やエナメロイドといった高度に石灰化した組織に覆われることによってさらにその有用性を高めていったものと思われる。

エナメル質は、一般的な魚類に認められる間葉性のエナメロイドとは異なり、上皮細胞に属するエナメル芽細胞によって形成される (Huysseune と Sire, 1998)。上皮性エナメル質の形態学的な起源は、シーラカンスや肺魚などの総鰭類のエナメル質に求められ (Satchell ら, 2000)、並行条の著明なエナメル質や有管エナメル質などを経て、我々のエナメル質に到ったと考えられている (後藤と大泰司, 1986; Huysseune と Sire, 1998)。しかし、肉眼的に類似した上皮性エナメル質に限定してもその微細構造は千差万別であり (後藤と大泰司, 1986; Huysseune と Sire, 1998)、エナメル質がどのような進

化を経てその形態を獲得してきたかについては明らかにされていない。

エナメル質の形成に関与するエナメル基質タンパクは、その 90%を占めるアメロジェニンと非アメロジェニンタンパク群に大別される (Termine ら, 1980; Fincham ら, 1999)。分子生物学的研究から、アメロジェニン、アメロプラスチンおよびエナメリンの遺伝子はその存在が確認されており (Hu と Yamakoshi, 2003), エナメル質の形態学的な変遷には、これらを含めた歯の形成に関与する遺伝子自身やその発現量, その発現部位や時期などの変化が大きく関わっていると推察されている (Jernvall と Thesleff, 2000)。

アメロプラスチン (Krebsbach ら, 1996) は非アメロジェニンタンパクの一種であり, エナメル結晶の成長とエナメル構造の決定に重要な役割を果たしていると考えられている (Robinson ら, 1998; Nanci ら, 1998; Paine ら, 2003)。このタンパクは別名アメリン (Cerny ら, 1996) あるいはシースリン (Hu ら, 1997) と呼ばれ, アメロジェニンやエナメリンと同様に, 歯に特異的に発現することが知られている (Simmer と Hu, 2001)。その mRNA の発現はほとんどエナメル芽細胞において認められるが, ヘルトビツヒの上皮鞘 (Fong ら, 1996) や前象牙芽細胞 (Fong ら, 1998) でも発現するとの報告もある。このように, 歯に特異的で他の組織には発現しないエナメル基質タンパクであるアメロプラスチンは歯の進化研究に適した分子である。アメロプラスチン遺伝子は最初ラットにおいてクローニングされ (Krebsbach ら, 1996), その後, 相同遺伝子がブタ (Hu ら, 1997), マウス (Simmons ら, 1998), ウシ (GenBank accession no. AF157019), ヒト (Toyosawa ら, 2000) においてクローニングされてきた。哺乳類以外の動物でクローニング

に成功したとの報告はまだないが、哺乳類のアメロブラスチン遺伝子間には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爬虫類にもアメロブラスチン遺伝子の存在することが予測された。

本研究の目的は、爬虫類のメガネカイマンワニ（ワニ）からアメロブラスチン遺伝子の相同遺伝子をクローニングし、その遺伝子やタンパクとしての特徴を明らかにし、哺乳類と比較することによって分子進化学的検討を加えることにある。また、ブタ歯胚を用いた研究では、エナメル質形成中のアメロブラスチンは、当初はエナメル基質の組織液に非常に可溶であるが、分解を受けるに伴って不溶性が増し、最終的にエナメル小柱鞘に集積することが明らかにされている（Uchida ら、1995）。このことがきっかけでアメロブラスチンは、エナメル小柱構造の構築と関係があるのではないかと考えられるようになった（Hu ら、1997）。しかし、エナメル小柱は脊椎動物が爬虫類から哺乳類への進化の過程で獲得した構造と考えられ、ワニを含めほとんどの爬虫類のエナメル質にはこの構造は存在しない。そこで、本研究においてはさらにワニアメロブラスチンの推定アミノ酸配列に基づき合成されたペプチドに対する抗体を用いて、形成中のワニの歯におけるアメロブラスチンタンパクの局在を調べ、形態学的な観点から進化過程におけるアメロブラスチン分布や機能の変遷に関しても検討を加えた。

材料と方法

1 トータル RNA の抽出およびゲノム DNA の抽出

(1) 組織の摘出

生後 3 日齢のメガネカイマンワニ（以下ワニと略； *Caiman crocodiles apaporiensis* ）に抱水クロラル（500mg/kg 体重）を腹腔内注射して全身麻酔を施し，顎骨，頸骨，心臓，脳，肝臓，筋肉の各組織を摘出し，使用するまで -70°C で保存した。

(2) トータル RNA の抽出

得られた組織をホモジェナイザー（ポリトロン PT2100, KINEMATICA, Cincinnati, OH）にて粉砕し，ISOGEN（ニッポンジーン，東京）を用いて以下の方法で RNA 抽出を行った。組織片 100mg に対して 1ml の ISOGEN を加えて溶解させ，室温にて 5 分間インキュベートした。この溶解物に 0.5ml のクロロホルムを加えて攪拌した後，室温にて 3 分間インキュベートした。粗 RNA を含む水層を取り出し，これに 0.5ml のイソプロパノールを，つづいて 70% エタノールにて洗浄後，乾燥し，1ml の 1mM EDTA を含む 10mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0; TE 緩衝液）に溶解した。

(3) ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は Ausubel らの方法（1998）に従い，筋肉組織より抽出した。組織片に，DNA 抽出バッファー（150mM NaCl, 10mM Tris-HCl（pH8.0）, 10mM EDTA, 0.1% SDS）および proteinase K（20mg/ml）（QIAGEN GmbH, Hilden, Germany）を加え， 55°C で 1 時間反応させた。さらに 37°C

にて一晩インキュベートした後、Tris-HCl フェノール (pH8.0) を加え、室温にて 20 分間混合し、DNA を含む水層を取り出した。得られた粗 DNA 画分に、飽和フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1) (PCI) を加え、室温にて 20 分間インキュベートした後、100%エタノールを加えて沈殿したゲノム DNA をガラス棒に巻き付けて回収した。これを 70%エタノールにて洗浄後、乾燥し、TE 緩衝液に溶解した。このようにして調製したゲノム DNA は波長 260nm における吸光度を測定して濃度を決定し、使用するまで 4°C にて保存した。

2 ワニアメロプラスチン遺伝子のクローニング

(1) ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR)

通常の PCR による DNA の増幅には AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) を用い、サーマルサイクラー GeneAmp 9600 (Applied Biosystems) を使用して反応を行った。PCR バッファーは添付の指示書に従って調製した。反応は最初に 95°C にて 9 分間熱変性を行い、続いて 95°C で 30 秒間の熱変性、至適温度による 30 秒のアニーリング、72°C で 2 分間の伸長を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間伸長反応を行った。

また、2kb を超えるような増幅領域の長い long and accurate PCR (LA-PCR) には TaKaRa LA-Taq PCR Kit ver. 2.1 (TaKaRa, 大津) を使用した。添付の指示書に従い反応液を調製し、最初の熱変性 (95°C, 3 分) を行った後、熱変性 (95°C, 30 秒)、アニーリング (至適温度, 30 秒)、伸長反応 (72°C, 5 分) を 35 サイクルと伸長反応 (72°C, 10 分) の条件で反応を行った。PCR 産物は、TAE 緩衝液 (40mM トリス, 40mM 酢酸, 1mM EDTA, pH8.0)

に 1.5%アガロース S (ニッポンジーン) を加えて加熱溶解したものを電気泳動用のゲルとして使用した。泳動用緩衝液には TAE 緩衝液を用い、100V 定電圧で 30 分間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとしては 1kb ラダー、および 100bp ラダー (New England Biolabs, Beverly, MA) を使用した。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液 (1 μ g/ml; 和光純薬) で 15 分間染色、15 分間水洗した後、波長 312nm の紫外線で DNA のバンドを検出した。

(2) Reverse Transcription (RT) - PCR

顎骨より得られたトータル RNA からオリゴ (dT) プライマーと SUPERSCRIPT Preamplification Kit (GibcoBRL, Grand Island, NY) を用いて、first-strand cDNA を合成した。これを鋳型としてヒトアメロプラスチン遺伝子特異的なプライマー AMB25 (アンチセンス: 5'-TTCATACTGTTGAGTTTCATGTTCTCTTGG-3'), AMB37 (センス: 5'-TGAGCCTTGAGACAATGAGACAG-3') を用いて、PCR を行うことによりワニアメロプラスチン遺伝子の断片を増幅した。

(3) 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) および 3'-RACE

完全長のワニアメロプラスチン cDNA を得るため、5'-RACE Kit および 3'-RACE Kit (GibcoBRL) を用いて 5'-および 3'-RACE を行った。5'-RACE を行うにあたっては、顎骨より得られた 1 μ g のトータル RNA に対し、ワニアメロプラスチン遺伝子特異的なプライマーである AMBC3 (アンチセンス: 5'-TGTAACCATGGAAATGAAGAGTGTG-3') を用いて first-strand cDNA 合成を行った。得られた cDNA の 5'末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてヌクレオチドホモポリマーにアンカー配列を付加

した後、これを鋳型としてアンカープライマーとワニアメロブラスチン遺伝子に特異的なプライマー AMBC4 (アンチセンス:5'-TGTGGAAGCATGTTTCATGTTTTGT-3') を用いて PCR を行った。3'-RACE はアダプター配列を付加したオリゴ (dT) プライマーを用いて first-strand cDNA を合成し、続いてワニアメロブラスチン遺伝子特異的なプライマー、AMBC2 (センス:5'-CACACTCTTCATTTCCATGGTTACA-3') およびアンカープライマーを用いて PCR を行った。

3 サブクローニング, シークエンス

(1) コンピテント細胞の作製

コンピテント細胞の作製には、Inoue ら (1990) の方法を用いた。*E. coli* XL2 株をテトラサイクリン (7.5 μ g/ml) を含む Luria-Bertani (LB) 寒天培地で 37°C、一晩培養した後、単一のコロニーを SOB 液体培地 (2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 20mM MgCl₂, 10mM MgSO₄) に接種し、18°Cで OD₆₀₀ 値が 0.6 となるまで振盪培養した。この培養液を氷冷水中で 10 分間冷却し、遠心して菌体を回収した。培養液の 1/3 容量の氷冷 TB 緩衝液 (10mM PIPES, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, 55mM MnCl₂) に懸濁し、さらに 10 分間氷冷した。再び遠心して菌体を回収し、培養液の 1/12.5 容量の氷冷 TB 緩衝液に懸濁し最終濃度 7%となるようにジメチルスルホキシドを添加し、10 分間氷冷した。この菌液を 500 μ l ずつクライオジェニックバイアル (2.0ml; Corning Coaster, Cambridge, MA) に分注し、ただちに液体窒素中に浸して使用時まで保存した。

(2) サブクローニング

検出したバンドをゲルごとメスにて切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて増幅した DNA をゲル中より抽出した。得られた DNA は pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI) にライゲーションし、これを *E. coli* コンピテント細胞 XL-2 に形質転換させた。また、DNA の長さが 1kb を超えるときは TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsland, CA) を用い、同様に形質転換を行った。

形質転換操作は上記の *E. coli* コンピテント細胞を氷上で融解し、同細胞 200 μ l と 2 μ l のプラスミド溶液 (100 μ g/ml) を混和し、氷水中で 30 分間保冷した。42 $^{\circ}$ C で 30 秒間保持した後、氷水中で 2 分間冷却した。これに 800 μ l の SOC 液体培地 (2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 20mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Sucrose) を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪培養した。必要に応じて各種抗生物質を加えた LB 寒天培地に接種し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。インサートの有無を確認した後、LB 培地を用いて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し、培養液から ABI Prism Miniprep Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてプラスミドを精製することによってクローンを得た。

(3) DNA シークエンス

シークエンスの鋳型となるプラスミドは 200 μ g/ml の濃度に調製した。サイクルシークエンス反応の反応溶液の調製は DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) の製品添付の指示書に従い、サーマルサイクラー GeneAmp 9600 (Applied Biosystems) を用いて行った。反応終了後、SigmaSpin Post-Reaction

Purification Columns (Sigma, St.Louis, MI) を用いて試料を精製した。これを自動 DNA シーケンサー (373 DNA sequencer, PE Applied Biosystems) によって塩基配列の決定を行った。

4 塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

DNA の塩基配列および推定されるアミノ酸配列の検討あるいはアライメントの作製にはコンピュータプログラム SeqPup (Gilbert, 1995) を用いた。アミノ酸配列の疎水性分析は Kyte と Doolittle (1982) の方法により行った。また、決定した配列の相同性検索はホモロジー検索サービス BLAST により行い、既知アメロプラスチンとの相同性の検討はコンピュータプログラム Dotty Plot (Gilbert, 1989) を使用して評価した。また、分子系統樹は Clustal X (Thompson ら, 1997) および Dendromaker computer programs (Imanishi, 1995) によって作成した。なお、この分子系統樹は近隣接合法 (Neighbor-Joining Method) に基づいて作製した (Saitou と Nei, 1987)。データ解析にあたり、ヒト (Toyosawa ら, 2000) ,ブタ (Hu ら, 1997), ウシ (GenBank accession no. AF157019), ラット (Krebsbach ら, 1996), マウス (Simmons ら, 1998) のアメロプラスチン遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列を参照した。

5 ワニアメロプラスチン遺伝子の遺伝子構造の決定

各エクソン-イントロンの境界領域が増幅できるようにプライマーを設計し、表 1 に示すプライマーセットを用いてゲノム DNA を LA-PCR にて増幅した。得られた増幅産物をサブクローニング、シーケンスし、cDNA 塩基配列と比較検討することによって、ワニアメロプラスチン遺伝子の遺伝子構造を決定し

た。

6 サザンブロット解析

(1) 制限酵素処理

10 μ g のゲノム DNA を 100U の制限酵素 *Eco*RI, *Pst*I, *Sma*I, *Bgl*II, *Xba*I (New England Biolabs, Beverly, MA) により処理した。反応後の溶液は飽和 PCI を用いて DNA を抽出し, 100%エタノールを加え, 沈殿した DNA をエタノールにて洗浄後, 乾燥し, 15 μ l の TE 緩衝液に溶解した。

(2) アガロースゲル電気泳動

TAE 緩衝液に 0.7%アガロース S を加えて加熱溶解したものを電気泳動用のゲルとして使用した。泳動用緩衝液には TAE 緩衝液を用い, 定電圧 (30V) で 16 時間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとしては 1kb ラダー (New England Biolabs) を使用した。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液で 15 分間染色後, 波長 312nm の紫外線で DNA のバンドを検出した。

(3) サザントランスファー

泳動後アガロースゲルをアルカリ溶液 (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) に 30 分間, ついで中和溶液 (1.5M NaCl, 1M Tris-HCl; pH7.4) に 30 分間浸潤させた。このアガロースゲルをナイロン膜 (Hybond-N+, Amersham Biosciences Corp.) に密着させ, 20 \times SSPE (3M NaCl, 173mM NaH₂PO₄, 25mM EDTA) を用いて, DNA 断片をナイロン膜上に転写した。DNA の転写されたメンブレンはクロスリンカー (CL-1000 ULTRAVIOLET CROSSLINKER, UVP. INC. Upland, CA) を用いて紫外線を照射することにより固定した。

(4) プローブの作製

ワニ下顎骨から得られた cDNA を鋳型とし、ワニアメロプラスチン遺伝子に特異的なプライマー AMBC6 (アンチセンス: 5'-CCTGTGTTAATTCTGGGGCTGTAG-3') および AMBC7 (表 1) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物は pGEM-T Easy Vector (Promega) を用いてサブクローニングを行い、プラスミドを調製した。1 μ g のプラスミドを制限酵素 *Eco* RI で処理した後、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、プローブとなる DNA 断片 (379bp) を得た。DNA 断片の標識は Random Primer Labeling Kit Ver.2 (TaKaRa) および [α -³²P] dCTP (37Mbpq/mmol; Amersham Biosciences Corp.) を用いてランダムプライマー法により行った。反応溶液の調製および反応条件は添付の指示書に従った。

(5) サザンハイブリダイゼーション

DNA ボトル (クラボウ, 倉敷) に転写後のナイロンメンブレンを入れ、ハイブリダイゼーション溶液 [5 \times SSPE, 50%ホルムアミド, 0.5%SDS, 5 \times Denhard 試薬 (0.1%Ficoll400 (和光純薬), 0.1%ポリビニルピロリドン (Sigma), 0.1% BSA (Sigma), 5 μ g/ml サケ精子 DNA (和光純薬)) を加え、DNA オープン (クラボウ) を用いて 10-20rpm で回転させながら 42 $^{\circ}$ C で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション溶液を捨て、新しいハイブリダイゼーション溶液と交換した後、標識したプローブを加えた。42 $^{\circ}$ C で 16 時間 10-20rpm で回転させながらインキュベーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、ナイロン膜は 1 次洗浄液 (2 \times SSPE, 0.1%SDS) を用いて 42 $^{\circ}$ C のインキュベータ内で 10 分間、さらに 2 次洗浄液 (0.1 \times SSPE, 0.1%SDS) を用いて 65 $^{\circ}$ C, 10 分間洗浄した。得られたナイ

ロン膜を -80°C にて1週間, X線用フィルム (XAR5, Kodak, Rochester, NY)] に露光させてオートラジオグラフィーを行った。

7 ワニアメロブラスチン遺伝子の発現

ワニアメロブラスチン遺伝子の発現を検討するため, 顎骨, 頸骨, 心臓, 脳, 肝臓から得たトータル RNA を用いて RT-PCR を行った。PCR は3組のワニアメロブラスチン遺伝子特異的プライマー, AMBC1 (表1) と AMBC3 (表1), AMBC5 (センス: 5'-ACAACGGAAGATGATAACCCTGCTA-3') と AMBC6 (前記) および AMBC6 と AMBC 7 (表1) を用いて行い, ハウスキーピング遺伝子である Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に特異的なプライマー GAPDH1 (センス: 5'-ATGGTCTACATGTTTCMARTATGA-3') , GAPDH2 (アンチセンス: 5'-CAAAGTTGTCRTKGATGACCTT-3') をコントロールとして使用した。

8 組織切片の作製

実験には生後1ヶ月のメガネカイマンワニ (Rep Japan, 静岡) を用いた。ワニにネンブタール (50mg/kg 体重) (大日本製薬, 大阪) の腹腔内注射による全身麻酔を施し, 左心室に5単位/ml ヘパリン (アペンディスファーマ, 東京) を含む生理食塩水を注入した後, 6%パラホルムアルデヒド (PFA) (0.1M リン酸緩衝液 (PB) にて pH7.4 に調製) 灌流固定を行った。顎骨ごと歯を採取し, 可能な限り軟組織を除去した。固定液の浸透を良好にするため, 顎骨を2分割した。続いて同固定液にて 4°C で一晩固定し, 0.1M PB にて洗浄を行った後, 15%グリセリンを加えた 10%エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA 2Na) (同仁化学研究所, 熊本) 溶液にて約10日間低温脱灰を行った。

なお、脱灰液は 1-2 日毎に交換した。

脱灰終了後、0.1M PB にて洗浄し、パラフィン包埋を行った。歯を含む顎骨を矢状断にて 3 μ m 厚の連続切片を作成し、シランコートスライドガラス（松波硝子，大阪）に貼付した。各々のサンプルの代表として一部の切片にはヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行った。

9 抗ワニアメロプラスチンポリクローナル抗体の作製

抗体を作製するにあたってワニアメロプラスチンの N 末領域および C 末領域に推定アミノ酸配列をもとにその配列と一致するペプチドを作製した。すなわち N 末端をシステイン化したアミノ酸残基 12-27（NH₂-CGTGFALPMYPQHTGTR-COOH）（A1 ペプチド）および 385-400（NH₂-CTLMAGNGAEQPQVMQD-COOH）（A4 ペプチド）に相当するペプチドを Applied Biosystems Synthesizer (Applied Biosystems)にて合成した後、高性能液体クロマトグラフィーによって精製し、アミノ酸分析を行った。各ペプチドを Inject Maleimide Activated mCKLH Kit (Pierce, Rockford, IL) を用いてキャリアタンパクであるキーホールリンペットヘモシアニンと結合させ免疫原とした。初回の免疫にはフロイント完全アジュバント (Difco, Franklin Lakes, NJ) と、2 回目以降の免疫にはフロイント不完全アジュバント (Difco) とともに超音波処理にて混和し、油中水型乳剤を作製した。この乳剤をニュージールランドホワイトラビット（北山ラベス，長野）の背部皮下に 2 週間毎に注射し、免疫を行った。各免疫処置の 2 週間後に耳介静脈より採血し、抗体価の上昇した血清を A1 ペプチドあるいは A4 ペプチドを結合させた SulfoLink Column (Pierce) によりアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製し

た。

10 リコンビナントワニアメロブラスチンによる抗体の評価

(1) リコンビナントワニアメロブラスチンの作製

ワニアメロブラスチン遺伝子のコード領域のうちシグナルペプチドに相当する配列を除外した cDNA は Platinum Pfx (Invitrogen) を用いて PCR を行うことにより増幅した。プライマーは CAMBF5 (センス: 5'-CGCGGATCCGCGTTTGCTTTGCCAAT-3') と CAMBR2 (アンチセンス: 5'-GGAATTCCAAGTATGCTCAGGGCTCTTGGAAAT-3') を使用した。これを pGEM-T Easy Vector (Promega) にライゲーションし、サブクローニングを行った。

作製したプラスミドおよび発現ベクター pGEX6P-1 (Amersham Biosciences Corp.) を制限酵素 *Eco* RI, *Bam* HI (New England Biolabs, Beverly, MA) にて処理し, Quick Ligation Kit (New England Biolabs) を用いてライゲーション反応を行った。反応生成物をコンピテント細胞 Rosetta (Novagen, Madison, WI) に形質転換した。挿入配列の方向とリーディングフレームはシーケンスを行うことにより確認した。これをアンピシリン (100 μ g/ml) とクロラムフェニコール (100 μ g/ml) を含有した 200ml の LB 培地にて分光光度計 Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences Corp.) における OD₅₅₀ 値が 0.4 に達するまで 37°C で振盪培養した。Isopropylthio- β -galactoside (IPTG, Sigma) を終濃度が 0.1mM となるように加えた後, さらに 20°C で 24 時間振盪培養を行った。菌体を 100mM の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 和光純薬) を含有する PBST により

懸濁し、超音波発生器 (UD-201, トミー精工, 東京) を用いて超音波破碎した。遠心後の上清をグルタチオンセファロースビーズ (Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences)) を用いて精製し, GST-ワニアメロプラスチン融合タンパクを得た。5ml の融合タンパクをセルロース膜チューブ (Seamless Cellulose Tubing, Small Size 18, 和光純薬) に注入した後, プロテアーゼ緩衝液 (50mM トリス-塩酸緩衝液, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM ジチオスレイトール (pH7.5)) を用いて 4°Cにて一晩透析を行った。透析終了後, 3U の PreScission Protease (Amersham Biosciences) を加え, 4°Cで 4時間反応させ, 再びグルタチオンセファロースビーズを用いて精製し, リコンビナントワニアメロプラスチンを得た。

(2) SDS-PAGE, ウェスタンブロット分析

リコンビナントワニアメロプラスチンに 2xSDS-PAGE sample loading buffer [SL 緩衝液: トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8), 100mM ジチオスレイトール (和光純薬), 20%グリセリン]を加え, 95°Cで 5分間加熱して SDS-PAGE 用試料とした。SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従って行った。4-20% のアクリルアミドグラジエントゲル (PAG ミニ「第一」4/20, 第一化学薬品, 東京) を使用し, タンパク分子量マーカーには Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD, Hercules, CA) を用い, 室温, 定電流 (40mA) 下にて電気泳動を行った。ゲルを 0.25%クマシーブリリアントブルーR-250 (Sigma) を含むメタノール-酢酸-水 (50%-5%-45%) 混合液で 30分染色し, メタノール-酢酸-水 (5%-7%-88%) 混合液 (脱色液) で脱色することで, タンパクのバンドを可視化した。

SDS-PAGE 後、セミドライ式ブロッティング装置 (Trans-blot SD, BIO-RAD) を用いてブロッティング緩衝液[トリス (25mM), グリシン (192mM), SDS (0.05%), メタノール (20%)]の存在下で定電圧 (10V) にて 50 分間通電することによりアクリルアミドゲル層からポリビニリジンフルオライド (PVDF) 転写膜 (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) へ転写した。この PVDF 膜を 2%BSA (Sigma) と 0.05% TritonX-100 を含む PBS (PBST) 溶液中に浸して室温で 1 時間振盪することによりブロッキングを行った。PVDF 膜を PBST で洗浄後、ウサギ抗ワニアメロプラスチン抗体 A1, A4 (以下それぞれ抗 A1 抗体, 抗 A4 抗体) を PBST 溶液を用いてそれぞれ 2000 倍, 2500 倍に希釈したものとともに 4°Cで一晩振盪し, 反応させた。ついで, PBST 溶液で 3 回洗浄後, PBST 溶液で 2500 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識のブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) と室温で 1 時間反応させた。PBST 溶液で 3 回洗浄後, 100mM 塩化ナトリウム, 5mM 塩化マグネシウムを含む 100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH9.5 ; AP 緩衝液) で洗浄し, 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 p-トルイジン塩 (和光純薬) とニトロブルーテトラゾリウムクロリド (和光純薬) を発色基質として添加し, バンドを可視化した。

11 免疫組織化学

免疫染色は streptavidin-biotin complex (SABC) 法によって行った。切片は脱パラフィン後, Dako ペン (ダコ・ジャパン, 京都) によるマーキングを行った。非特異的の反応を阻止するため, 1%ウシ血清アルブミン含有トリス緩衝生理食塩水 (pH 7.6; TBS-BSA) で希釈した正常ブタ血清 (1:10) (Dako)

と 30 分間反応させた。次に TBS-BSA で希釈した抗ワニアメロプラスチン抗体（一次抗体）と 4°Cで一晩反応させた。なお、一次抗体の希釈倍率は 1:10（抗 A1 抗体）、1:50（抗 A4 抗体）とした。その後、二次抗体としたビオチン標識ブタ抗ウサギ IgG 抗体（1:1000）（Dako）と室温にて 40 分間反応させた後、0.6%過酸化水素（和光純薬）を添加したメタノールに 15 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化させた。続いて TBS-BSA で希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン複合体（1:100）（Dako）と 30 分間反応させて免疫染色を行った。免疫反応産物の発色は 0.02% 3,3'-ジアミノベンチジン・4 塩酸（DAB）（同仁化学研究所）と 0.02%過酸化水素水を含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液（pH7.6）で 5 分間反応させた。以上の免疫組織化学的染色の各ステップの終了後には切片を 4°Cの TBS で充分洗浄した。各々の切片は、メチルグリーンにより、対比核染色を行い、脱水、透徹後、MGK-S（松波硝子）で封入した。

結果

1 ワニアメロブラスチン cDNA 塩基配列および推定アミノ酸配列

アミノ酸のコード領域を全て含んだ完全長のワニアメロブラスチン cDNA はオーバーラップした 3 つの断片クローン (5'RACE, プライマー AMB25 と AMB37, 3'RACE で得られたクローン) を統合することにより得た (GenBank accession no. AY043290)。塩基配列および推定アミノ酸配列を図 1 に示す。ワニアメロブラスチン cDNA は 1221 塩基, 407 アミノ酸残基から成るオープンリーディングフレーム (ORF) を含む 1909 塩基から構成されていた。125 塩基からなる 5'非翻訳領域 (UTR) に続き, 126 位から翻訳領域が開始し, 1349 位で終止していた。その下流には 560 塩基からなる 3'UTR が存在し, 推定されるポリアデニレーションシグナル配列 (Poly-A シグナル; AATAAA) は 1443 位, 1646 位, 1823 位の 3 箇所に認められた。なお, 得られたクローンにはさらに 2 種類の異なったクローンが存在した。一つはエクソン 3 に相当する, 16 アミノ酸残基をコードした 48bp が全く欠失したクローンであり, もう一つは 3'UTR が 1443 位に存在する第一の Poly-A シグナルにて終止したクローンであった。

塩基配列より推定されるアミノ酸配列から, ワニアメロブラスチンは N 末領域に 16 個のアミノ酸残基からなる疎水性のシグナルペプチドを有していた。また, 推定分子量は 42.5kDa であり, 予測等電点は 5.39 であった (表 2)。さらに, ワニアメロブラスチンのアミノ酸構成比率は哺乳類のそれに酷似し, プロリン (13%), グリシン (11%), ロイシン (9%), アラニン (8%) に富み, システインを含有していなかった (図 2)。哺乳類アメロブラスチンの推

定アミノ酸配列と比較し、相同検索を行った結果において、ワニアメロブラスチンは既知の哺乳類のアメロブラスチンと相同性を示した（47%~38%）。図3に示すように、アミノ酸配列の疎水性分析の結果を比較しても、疎水性のシグナルペプチド部に続いて短い親水性のアミノ酸残基が配列し、その後は疎水性と親水性領域は交代して現れ、最後のC末領域は親水性で終わるという哺乳類アメロブラスチンに認められる特徴は共通していた。図4にワニとヒトのアメロブラスチン推定アミノ酸配列によるドットプロットマトリクス分析の結果を示す。C末領域に比べN末領域に多くのドットがライン上に位置してプロットされ、N末領域の保存性が極めて高いことを示している。図5にワニと哺乳類のアメロブラスチン推定アミノ酸配列によるマルチプルアライメントを示す。哺乳類で保存されている3つのリン酸化部位のうち、プロテインカイネースCに対するリン酸化部位は認められなかったものの、残り2つのプロテインチロシンカイネース、カゼインカイネースIIに対するリン酸化部位はアミノ酸残基第87座位、227座位に保存されていた。これらの周辺領域におけるアミノ酸配列の保存性は高く、特にN末側のリン酸化部位である第87座位周辺は第83座位から第104座位にかけての22アミノ酸残基は極めて高い保存性を示した。なお、C末領域の保存性はN末領域に比べて低いものの、数個のアミノ酸残基からなる高度な保存領域が散在していた。さらに、推定された翻訳開始アミノ酸残基メチオニン（図5、コンセンサス配列の第6座位；#で示す）は、哺乳類で推測されていた位置とは一致せず、さらに10残基C末寄りに存在するもう一つの保存されたメチオニン（第16座位；##で示す）と一致していた。

2 アメロブラスチンの分子系統樹

図6に推定アミノ酸配列を基に作製した分子系統樹を示す。ワニアメロブラスチンは哺乳類のアメロブラスチンが構成するクラスターの外側に位置し、既知の系統的位相関係を示した。

3 アメロブラスチン 3'UTR の保存性

ワニおよび哺乳類アメロブラスチン遺伝子の3'UTRの塩基配列から作製したマルチプルアライメントを図7に示す。哺乳類アメロブラスチン間では塩基数もほぼ一致しており、その相同性は78%以上を示した。ワニと哺乳類の間では塩基数こそワニがやや多いものの、相同性は50%を示し、8カ所の保存性に富んだ領域(図7の囲みで示す)が認められた。さらにこれらの塩基配列から分子系統樹を作製したところ(図8)、その位相関係は既知の位相関係を呈したが、哺乳類アメロブラスチン枝の長さはどれも非常に短く、哺乳類アメロブラスチンがワニアメロブラスチンに対して一つクラスターを形成していた。

4 ワニアメロブラスチン遺伝子構造

ワニおよびヒトアメロブラスチン遺伝子の遺伝子構造の模式図を図9に示す。ワニアメロブラスチンのエクソン-イントロン境界部の塩基配列およびイントロンの長さを表3に示す。ワニアメロブラスチンは11個のエクソンから構成され、ゲノムDNAから得られた塩基配列はcDNAの34-1809位における塩基配列を全て含んでいた。判明した全てのスプライス部位のイントロン相はコドンとコドンの間にスプライスするタイプ0であり、スプライス供与部位は'GT'で始まり、スプライス受容部位は'AG'に終止していた。13個のエクソンから成るヒトアメロブラスチンにおいて重複配列であることが判っているエクソン7, 8, 9のうち、ワニアメロブラスチンにおいてはエクソン8, 9

に相当する配列は存在しなかった。なお、比較したワニ 5 匹のゲノム DNA と cDNA の塩基配列にポリモルフィズムは認められなかった。

5 サザンブロット解析

ワニアメロプラスチン cDNA の 792-1173 位に対応する DNA 塩基配列 (379bp) を PCR で増幅し、サブクローニング後、コンピテント細胞に形質転換し、増幅したプラスミドを制限酵素で処理することでプローブを作製した。これを用いて、ワニゲノム DNA の制限酵素 (*Eco* RI, *Pst* I, *Sma* I, *Bgl* II, *Xba* I) 消化産物に対してサザンブロット解析を行った。結果を図 10 に示す。用いた 5 種類すべての制限酵素産物に対して陽性で、オートラジオグラム上で単一のバンドとして認められた。

6 ワニアメロプラスチン遺伝子の発現

抽出した 5 種類の組織 (顎骨, 頸骨, 心臓, 脳, 肝臓) のトータル RNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、各組織におけるアメロプラスチン遺伝子の発現を検討した。図 11 に結果を示す。ポジティブコントロールとして、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH に特異的なプライマーセット, GAPDH1 と GAPDH2 を用いて PCR を行った場合、すべての組織から得られた cDNA からほぼ一致した増幅度と長さを示す単一バンドが増幅された。一方、ワニアメロプラスチン遺伝子特異的な 3 つのプライマーセット AMBC1 と AMBC3, AMBC5 と AMBC6, AMBC6 と AMBC7 を用いて PCR を行った場合には、顎骨由来の cDNA を鋳型とした場合には、予測した長さと一致する 111bp, 256bp, 381bp の単一のバンドが認められた。しかしながら、頸骨, 心臓, 脳, 肝臓由来の cDNA からは全く何も増幅されなかった。なお, GAPDH

に特異的なプライマーによって得られた *GAPDH* cDNA 断片はクローニング後にシーケンスし、ワニ *GAPDH* cDNA (GenBank accession no. AY043291) であることを確認した。

7 抗ワニアメロプラスチンペプチド抗体の特異性の評価

図12に得られたリコンビナントタンパクの SDS-PAGE の結果を示す。

SDS-PAGE 上で GST-ワニアメロプラスチン融合タンパクは分子量 81kDa の単一バンドとして認められ、PreScission Protease 処理後のワニアメロプラスチンリコンビナントタンパクは分子量 55kDa の単一バンドとして分離された。図13に抗 A1 抗体あるいは抗 A4 抗体を用いて行ったウエスタンブロット分析結果を示す。ウエスタンブロット分析においては、抗 A1 抗体を使用した場合においても、抗 A4 抗体を使用した場合においても反応は約 55kDa 付近のバンドとして確認された。この反応はそれぞれの抗体の抗原ペプチドとともに反応させた場合 (抗 A1 抗体と A1 抗原, 抗 A4 抗体と A4 抗原) には消失したが、異なった抗原ペプチドとともに反応させた場合 (抗 A1 抗体と A4 抗原, 抗 A4 抗体と A1 抗原) には影響を受けなかった。このことから、抗 A1 抗体と抗 A4 抗体はワニアメロプラスチンの異なる領域 (N 末領域と C 末領域) を認識する事が確認された。

8 ワニ歯胚におけるアメロプラスチンの免疫組織化学染色

(1) エナメル基質分泌開始以前におけるアメロプラスチンタンパクの分布

エナメル芽細胞ならびに象牙芽細胞が分化する前の時期の歯胚の免疫組織学的染色像と HE 染色像を図14A-C に、エナメル基質分泌開始されていない象牙質形成開始期の同像を図14D-F に示す。HE 染色像でエナメル器の形成

が確認される時期（図14A）において、それを構成するエナメル上皮細胞や歯乳頭細胞に抗 A1 抗体、抗 A4 抗体への反応はともに認められなかった（図14B, C）。エナメル器がさらに発達し、象牙質基質の分泌が開始された時期（図14D）においても、前エナメル芽細胞や象牙芽細胞をはじめエナメル器に反応は全く認められず（図14E, F）、アメロブラスチンの存在は確認できなかった。

(2) エナメル基質分泌期におけるアメロブラスチンタンパクの分布

エナメル基質分泌期の HE 染色像（図15A, B）と免疫組織学的染色像（図15C, D）を示す。HE 染色像において、エナメル芽細胞の高さの発達と分泌が開始されたエナメル基質の均一な染色が認められるこの時期（図15B）に、抗 A1 抗体に対する反応もまた分泌されたエナメル基質全体に一様に認められた。特にエナメル-象牙境の反応は強く（図15C）、分泌されたエナメル基質層の幅が広くなるほどその強度は増している。なお、象牙質における反応は認められないかあるいは認められても非常に弱く、エナメル芽細胞および象牙芽細胞における反応は全く認められなかった。一方で、抗 A4 抗体に対する反応はエナメル基質に均一には認められず、エナメル芽細胞と接する一層に限局して反応が認められ（図15D）、その他のエナメル基質領域では、反応は認められないかあるいは認められても非常に弱かった。象牙質や象牙芽細胞における反応は全く認められなかったが、エナメル芽細胞内には粒状の反応が多数認められた。

(3) エナメル基質成熟期前期におけるアメロブラスチンタンパクの分布

エナメル基質成熟期前期の HE 染色像（図16A）と免疫組織学的染色像（図

16B, C) を示す。HE 染色像において、エナメル基質の分解と吸収、石灰化が進行していると考えられるこの時期 (図16A) においても、抗 A1 抗体と抗 A4 抗体への反応は異なり、それぞれの局在は分泌期のそれと一致していた。すなわち、抗 A1 抗体に対する反応は残存するエナメル基質全体に認められ、エナメル-象牙境の反応は強かった (図16B)。抗 A4 抗体に対する反応はエナメル芽細胞と接する一層に限局して反応が認められ (図16C)、エナメル芽細胞内には粒状の反応が多数認められた。

(4) エナメル基質成熟期後期におけるアメロブラスチンタンパクの分布

エナメル基質成熟期後期の免疫組織学的染色像と HE 染色像を図17に示す。HE 染色像において、エナメル基質の石灰化がほぼ完了していると考えられるこの時期 (図17A, B) において、エナメル基質分泌期から成熟期前期にかけてエナメル基質に均一に認められた抗 A1 抗体に対する反応は基質が分解されるに従って消失し、成熟期後期に至ってはほとんど認められなくなった (図17C, D)。また、エナメル-象牙境に強く認められた反応も同様に減少し、やはり同時期にはほとんど認められなくなった。反対に、抗 A4 抗体に対する反応はエナメル芽細胞内に認められる粒状の染色は基質が分解されるに従って減少するものの、エナメル芽細胞と接する一層に限局した反応とともに成熟期後期においても継続し、石灰化の完了時期に消失した (図17E, F)。

考察

これまでアメロプラスチン遺伝子は Krebsbach ら (1996) によってラットからクローニングされたのをきっかけとして、ブタ (Hu ら, 1997)、マウス (Simmons ら, 1998)、ウシ (GenBank accession no. AF157019) およびヒト (Toyosawa ら, 2000) と次々とクローニングされてきた。これら哺乳類アメロプラスチン遺伝子群の塩基配列から求められた推定アミノ酸配列を比較すると、アミノ酸の構成比率やその他の特徴も極めて類似しており (Toyosawa ら, 2000)、アミノ酸配列は 58~93%の相同性を示した。これらの極めて高い相同性から、機能遺伝子としてのアメロプラスチンは進化の過程で負の選択圧がかかり、保存された遺伝子であると考えられたため、哺乳類以外の動物においても同遺伝子の存在が予測できた。

ここ数年来、爬虫類のワニから歯に関係した遺伝子のクローニングがなされてきた (Toyosawa ら, 1998, 1999)。ワニは、哺乳類が直接分岐し、哺乳類の祖先となった爬虫類とは異なった祖竜類の唯一の生き残りであると考えられている (Ferguson, 1981)。しかしながらワニは、他の爬虫類とは異なり、歯が歯槽に歯根膜を介して顎骨に植立されているという、哺乳類と類似した特徴を有している (McIntosh ら, 2002)。これはおそらく、隔たった種間であっても同じ環境で生活した結果、類似の形態学的特徴を有する現象、収斂進化の結果であると思われるが、ワニは爬虫類から哺乳類への進化においてこのような“生きた化石”としての形態を有しており、歯の進化を研究する上で非常に有意義で興味深い生物である。

そこで、爬虫類におけるアメロプラスチン遺伝子の有無を検討するため、ワニを用いて相同遺伝子の cDNA クローニングを行ったところ、哺乳類のアメロプラスチン遺伝子と多くの共通な特徴を有する遺伝子を同定することに成功した。

1 ワニアメロプラスチン遺伝子の同定とその特徴について

得られた塩基配列より推定した同タンパクのアミノ酸構成比率は哺乳類アメロプラスチンと同様にシステインを含有せず、プロリン、ロイシン、アラニン、グリシンに富んでおり (図 2)、哺乳類で 4.54~5.54 と予測されるタンパクの等電点は 5.39 であり、39.3~45.3kDa と推定される分子量は 42.5kDa であった (表 2)。また、アミノ酸配列の疎水性分析の結果においても、タンパクの疎水性・親水性領域の配置は哺乳類のそれと類似していた (図 3)。

アミノ酸配列の相同性は哺乳類とワニの間で 38~47% であり、それほど高い値ではなかったが、これはアメロプラスチンの N 末のアミノ酸配列は高度に保存されているものの、C 末領域は一部の断片的なペプチドを除いて保存性が低いこと (図 4) が原因であると考えられた。さらに、哺乳類で保存されている 3 つのリン酸化部位のうち、2 つのリン酸化部位は保存されており、これらの周辺領域におけるアミノ酸配列も保存性が高かった (図 5)。N 末側のリン酸化部位である第 87 座位 (図 5、コンセンサス配列の第 111 座位) 周辺は第 83 座位から第 104 座位 (図 5、コンセンサス配列の第 107~128 座位) にかけての 22 アミノ酸残基が哺乳類と比較しても、2 つの置換と 1 つの挿入が認められるだけの極めて高い保存性を示した。また、第 227 座位 (図 5、コンセンサス配列の第 295 座位) のリン酸化部位はセリンーセリンーグルタミ

ン酸—グルタミン酸というカゼインカイネース II に対するモチーフが全ての動物に保存されていた。分子進化学においては、タンパクにおいて重要な機能を司る領域はそうでない領域よりも進化速度が数倍遅くなり、保存されると考えられている。進化速度とは経時的に蓄積する変異の比率のことであるが、一般的に、一座位あたりの分子が1年あたりにどのくらい変異するかを表す確率的な値であり、機能遺伝子の場合平均が 0.9×10^{-9} /アミノ酸座位/年 (Li ら, 1985) である。つまり、あるアミノ酸に着目した場合、そのアミノ酸が変異するのは11億年に1回ということになる。たとえば、インスリンはその前駆体であるプロインスリンが A, B, C 3つのペプチドに切断され、機能を発揮するが、そのうちの C ペプチドは早期に除去されて、インスリンの機能は A, B ペプチドが担っている。この場合、C ペプチドの進化速度は 2.4×10^{-9} /アミノ酸座位/年であるのに対して、A, B ペプチドの進化速度は 0.4×10^{-9} /アミノ酸座位/年であり、非機能ペプチドは機能ペプチドの数倍速い進化速度を示すことが確かめられている (Kimura, 1983)。従って、これらの保存された領域はアメロプラスチンの機能に関して重要な役割を担っていると考えられ、保存されたリン酸化部位はその部位の翻訳後修飾がアメロプラスチンの機能時に必要であることを示唆している。

2 ワニアメロプラスチン遺伝子の翻訳開始位置について

これまでに報告されてきた哺乳類のアメロプラスチン推定アミノ酸配列には5'末に2つの保存されたメチオニン (図5, コンセンサス配列の第6および16座位) の存在が確認され、どちらが本当の翻訳開始位置かは不明であった (Krebsbach ら, 1996; Hu ら, 1997; Simmons ら, 1998)。便宜的にそ

れぞれを第 1ATG, 第 2ATG と表し, 哺乳類とワニアメロブラスチンの翻訳開始コドン (ATG) を含んだ 5'末領域の塩基配列によるマルチプルアライメントを図 18 に示す。ワニアメロブラスチンは第 2ATG はその配列が哺乳類と一致するものの, 第 1ATG に相当する位置に存在する塩基配列は AGC であり, ワニには第 1ATG が存在しなかった。この第 2ATG の 3 塩基上流 (-3 位) にはアデニン (A) が存在し, 一般に -3 位にはプリン塩基が存在するという Kozak (1984) の報告の条件を満たしている。さらに, このことはそのすぐ上流 (-6 位~-4 位) には終止コドン TGA が存在することからも支持される。以上の結果は, 哺乳類のアメロブラスチンでも第 2ATG から翻訳を開始している可能性が高いことを示唆しており, これは第 1ATG の -3 位はプリン塩基ではなくピリミジン塩基のチミン (T) であることから強く支持されるものと考えられる。

3 アメロブラスチン遺伝子の分子系統樹について

ワニアメロブラスチンの推定アミノ酸配列をもとに分子系統樹を作製すると, ワニは哺乳類のアメロブラスチンが構成するクラスターの外側の既知の系統的関係を示した (図 6)。この系統樹は, 同様の方法で描かれたアメロジェニンの分子系統樹の形態と系統関係が一致している (Toyosawa ら, 1998)。ただ, アメロジェニンに比べてアメロブラスチンの遺伝的な距離を表す各々の枝の長さは大きい。これはアメロブラスチンの進化速度が機能遺伝子の平均値である 0.9×10^{-9} /アミノ酸座位/年に近似であるのに対して, アメロジェニンは 0.5×10^{-9} /アミノ酸座位/年と遅く (Toyosawa ら, 1998), エナメル基質タンパクの大部分を占めるアメロジェニンには進化における負の選択が強く作用

しているためと考えられる。

4 アメロブラスチンの 3'UTR について

アメロブラスチンの 3'UTR の塩基配列を比較すると、その相同性は通常に比べて極めて高く、一般的には難しいマルチプルアライメント (図 7) や分子系統樹の作製 (図 8) が可能であった。特に哺乳類間での相同性は著しく、最低でも 78%を示した。3'UTR は mRNA の発現、安定化、局在に関わっているとの報告 (Wickens ら, 1997; Conne ら, 2000) があるが、通常、哺乳類間においても全く相同性を示さないことが一般的であり (Shintani ら, 1999), 3'UTR の保存性が高いのは重要な機能があることを示唆している (Yaffe ら, 1985; Rouault ら 1993; Wedemeyer ら, 2000)。従って、少なくとも哺乳類のアメロブラスチン遺伝子の 3'UTR は何か重要な機能を有している可能性が考えられる。

5 ワニアメロブラスチン遺伝子の遺伝子構造について

ワニアメロブラスチン遺伝子は 11 個のエクソンとそれに介在する 10 個のイントロンより構成されていた。これは 13 個のエクソンと 12 個の介在するイントロンから構成されているヒトのアメロブラスチン遺伝子 (Toyosawa ら, 2000) よりエクソンが 2 個少ない結果であった。これはヒトアメロブラスチンにおいて重複配列であることが判っているエクソン 7, 8, 9 のうち、ワニアメロブラスチンにおいてはエクソン 8, 9 に相当する配列が存在しないためである。アメロブラスチン遺伝子の遺伝子構造はこれまでにヒトの他はラット (Lee ら, 2003) でしか解明されていない。したがって、他の哺乳類との比較は不可能であるが、その cDNA 塩基配列から推測するとヒト以外の哺乳類

においてもワニと同様にエクソン 8, 9 に相当する重複配列は見つからない。ゆえにエクソン 8, 9 は爬虫類・哺乳類においては通常存在せず、ヒトにおいてのみ遺伝子内重複を起こしてこれらのエクソンが出現したのではないかと推測された。また、ラットアメロプラスチン遺伝子はスプライシングによって幾つかの異なるタンパクを生み出すことが報告されている (Lee ら, 2003)。ワニにおいても異なるクローンが 2 つ確認されているが、これはワニアメロプラスチン遺伝子のイントロン相は全てタイプ 0 であり、容易にスプライシングを起こせる条件下にあるからであろう。なお、遺伝子構造の解析からは、ワニアメロプラスチンの開始コドンであると考えられた第 2ATG はエクソン 2 に存在することも判明し、少なくともワニにおいてエクソン 1 はアミノ酸をコードしないエクソンであると判断された。

6 ワニアメロプラスチンのゲノム上におけるコピー数の検討

アメロプラスチン遺伝子はヒトにおいてのみ、その遺伝子座の検討がなされており、常染色体の 4q.13 に位置する。本研究ではワニアメロプラスチンのゲノム上におけるコピー数を検討するために、cDNA プローブを用いてサザンブロット解析を行った。その結果、反応は 5 種類すべての制限酵素産物に対してオートラジオグラム上で単一のバンドとして認められた。この結果は、ヒトで同様の実験を行った場合の結果と一致していた (Toyosawa ら, 2000)。従って、このことにより、ヒトと同様にワニにおいてもアメロプラスチンの遺伝子座はゲノム上に 1 つである可能性が示唆された。

7 ワニアメロプラスチン遺伝子の発現について

摘出した 5 種類の組織のトータル RNA より合成した cDNA を鋳型として

PCR を行い、各組織におけるアメロラスチン遺伝子の発現を検討した。用いたプライマーセットはワニアメロラスチン cDNA のそれぞれ異なった領域を増幅するように設計したが、顎骨由来の cDNA を鋳型とした場合にのみ全てのプライマーセットに反応があり、その他の組織由来の cDNA にはどのセットにも反応がなかった。このことからアメロラスチン遺伝子は顎骨、おそらくは歯のみで発現していると考えられた。

8 ワニ歯胚におけるアメロラスチンの免疫組織化学染色について

ワニアメロラスチンリコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロット分析の結果から、抗 A1 抗体と抗 A4 抗体はワニアメロラスチンの異なる領域（N 末領域と C 末領域）を認識する事が確認された。しかしながら、分泌期、成熟期を通じて、抗 A4 抗体に対する反応がエナメル芽細胞内に認められるものの、抗 A1 抗体に対する反応は認められなかった。抗 A1 抗体は基質中のアメロラスチンに対しては十分に反応することから、この抗体は分泌後に折り畳まれ、三次元的な構造をとったタンパクを認識するのか、あるいは N 末ペプチドに対する抗体であることから、シグナルペプチドが除去された状態のタンパクを認識すると思われた。

アメロラスチン遺伝子の mRNA 発現やタンパクの局在や時期に関しては、これまでにマウスやラット、ブタ、ヒトのサンプルを用いて *in situ* hybridization や免疫組織化学的染色法を用いて検討され、(Uchida ら, 1995; Lee ら, 1996; Cerny ら, 1996; Fong ら, 1996; Murakami ら, 1997; Hu ら, 1997; Bosshart と Nanci, 1998; Begue-Kirn ら, 1998; Fong ら, 1998; Uchida ら, 1998; Nanci ら, 1998;

MacDougall ら, 2000; Lee ら, 2003), その結果, ブタやラットの形成期エナメル質において, トルイジンブルー染色で基質が一様に染色される時期に抗アメロラスチン抗体を用いて免疫染色を行うと, エナメル小柱鞘に限局してその反応が認められることが報告されてきた (Murakami ら, 1997; Hu ら, 1997; Uchida ら, 1997)。エナメル小柱構造の一つの構成単位はエナメル小柱とその周辺の小柱間エナメル質からなり, 両者の境界に当たるのが小柱鞘で, この部分はエナメル質の中で最後に石灰化する部分であると考えられる事から, アメロラスチンとエナメル小柱構造の構築との間になんらかの関係があるのではないかと推察されてきた。Hu ら (1997) はエナメル小柱鞘が最後まで石灰化しないのは, エナメル形成の成熟期においてここをエナメル質深部で分解されたエナメルタンパク質の排出路として確保するためであり, この役目を担っているのがアメロラスチンであると推察している。また, Paine ら (2001) はアメロラスチンがアメロジェニンと相互作用する能力がないことから (Paine ら, 1998a, 1998b), 分泌されたエナメル基質内に境界を作り出す役目を果たしているのではないかと推測している。このように哺乳類のエナメル質においてアメロラスチンと関連とその役割が様々に推測されているエナメル小柱構造は, すべての動物種のエナメル質に共通する構造ではない。脊椎動物は現存する大部分の爬虫類に認められるような無小柱エナメル質から小柱間質を伴わない前小柱的段階を経て, 哺乳類に認められる小柱間質を伴ったエナメル小柱を獲得したと考えられ (Osborn と Hillman, 1979), 本研究でアメロラスチン遺伝子の存在が確認されたワニのエナメル質には存在しない。

そこで、我々はワニのエナメル質におけるアメロブラスチンの分布についてさらに詳しく検討するために、免疫組織化学的染色を行った。図 19 にそれぞれの抗体に対する反応がどのように変化したかをあらわした模式図を示す。哺乳類においては、前エナメル芽細胞 (Lee ら, 1996), 前象牙芽細胞 (Begue-Kirn ら, 1998; Fong ら, 1998) に局在を報告している研究も存在するが、ワニにおいては、エナメル芽細胞が分化し、エナメル基質の分泌が開始されるまで、エナメル器に両抗体に対する反応はなかった。抗 A1 抗体に対する反応は基質分泌期にはエナメル基質全体に反応が認められ、その反応は多くの研究が哺乳類で報告してきたように、エナメル-象牙境で強かった (Uchida ら, 1995; Lee ら, 1996; Fong ら, 1998; MacDougall ら, 2000)。そして、エナメル質の成熟とともに徐々に消失し、成熟期後期には全く認められなくなったが、抗 A4 抗体に対する反応は基質分泌期からエナメル芽細胞内とそれに接する一層のエナメル基質に限局し、その反応は成熟期後期に至っても継続した。しかし、一部の研究者が報告しているような (Fong ら, 1996, 1998) ヘルトビッチの上皮鞘やセメント-エナメル境、セメント質、マラッセの残存上皮に反応は認められなかった。この結果は、ラットやブタで認められた、幼若エナメル質においてアメロブラスチンの N 末ペプチドは基質全体に (エナメル小柱鞘に限局してはいるが) 分布するのに対して、C 末ペプチドはエナメル質表層に限局するという結果 (Uchida ら, 1998) と非常によく似ている。ラットやブタにおいては、アメロブラスチンは分子量 55kDa のコアタンパクとして合成された後、翻訳後修飾を受け 65~70kDa のタンパクとして分泌される。分泌後は速やかに分解切断され、分子量約 20kDa の比較的小さ

な N 末ペプチドと約 50kDa の C 末ペプチドになる。N 末ペプチドはその後ゆっくりと分解を受け 10~20kDa の多数のペプチド片に分解され機能を営んでいるようである (Murakami ら, 1997; Uchida ら, 1998)。これらのことから、ワニにおいてもアメロプラスチンが分泌後ペプチド片に分解され、少なくとも N 末および C 末ペプチドは哺乳類と共通の機能を営んでいるタンパクであることが推察された。Uchida ら (1998) は C 末ペプチドが幼若エナメル質表層に限局して認められる理由を、C 末ペプチドは N 末ペプチドに比べ、早期に急速に分解を受けるためであると推察している。確かに、前述したごとく、C 末ペプチドの推定アミノ酸配列は保存性に乏しく、機能的に重要でないと考えらるなら早期に急速に分解されていると考えられるかもしれない。しかしながら、ワニとラットやブタで N 末ペプチドのみならず、C 末ペプチドの分布も酷似していた。もし、C 末ペプチドに何か機能があると仮定すると、この幼若エナメル質表層に限局した分布は分解の結果ではなく、はじめから限局して分布し、機能している可能性が考えられる。Cerny ら (1996) はラットのアメロプラスチン C 末ペプチドが細胞表面のタンパクと結合する可能性のあるペプチドドメインを有していることを指摘しており、実際にアメロプラスチンはエナメル芽細胞のトームス突起の滑走面に局在している (Nanci ら, 1998)。残念ながら、このペプチドドメインは他の種のアメロプラスチンには見つからないが、ブタにおいてもアメロプラスチンはエナメル芽細胞のトームス突起の滑走面に局在している事が判っている (Murakami ら, 1997; Paine ら, 2001)。同様にアメロプラスチンのノックアウトマウスの研究から、福本ら (2003) はこのタンパクがエナメル芽細胞と幼若エナメル質との接着に関

与していると示唆しているが、これには C 末ペプチドが関与している可能性が考えられる。

このように哺乳類と共通の分布を示す一方で、ワニアメロブラスチンが何らかのエナメル構造に関与している所見は認められなかった。これは爬虫類から哺乳類が進化した際に Dhamija ら (1999) が述べたようなアメロブラスチンの発現のタイミングやその質に変化が起きた結果であるとも考えられるが、Nanci ら (1998) のようにアメロブラスチンの分布パターンがエナメル小柱鞘に一致して認められるのは、基質が吸収される過程における一時期の分布パターンを示しているに過ぎないと捉えている者もいる。他方、アメロブラスチンがエナメル芽細胞のトームス突起の滑走面に局在していることから考えると、アメロブラスチンの局在はトームス突起により引き起こされたものとの推測も可能である。エナメル小柱構造の構築にはトームス突起が寄与している (Sasaki と Higashi, 1983 ; Huysseune と Sire, 1998) のであれば、エナメル芽細胞にトームス突起を持たないワニにおいてはワニアメロブラスチンがエナメル構造に関与している所見は認められないのは当然であろう。

本研究の結果、爬虫類であるワニにも歯に特異的なアメロブラスチン遺伝子が存在することが明らかとなり、アメロブラスチンは爬虫類と哺乳類に共通する機能を保存しつつ、平均的な進化速度で進化していることが示唆された。今後さらにこの分子の進化に関する研究を押し進めるためには、これらの生物のアメロブラスチンのプロモーターやその他転写発現機構の解明が必要であると考えられる。

結論

爬虫類ワニからアメロブラスチン遺伝子の相同遺伝子をクローニングして、以下の結果を得た。

- 1 ワニアメロブラスチンの cDNA 塩基配列を決定した。
- 2 ワニアメロブラスチン遺伝子の推定アミノ酸構成比率，推定分子量・等電点などは多くの点で既知の哺乳類と類似していた。
- 3 ワニアメロブラスチン遺伝子は 11 個のエクソンより構成され，その遺伝子構造はヒトと類似していたが，ワニではヒトのエクソン 8，9 にあたる重複配列が認められなかった。
- 4 ワニアメロブラスチン遺伝子のゲノム DNA におけるコピー数は一つであり，歯においてのみ発現する遺伝子であると考えられた。
- 5 ワニアメロブラスチンの推定アミノ酸配列に基づき合成されたペプチドに対する抗体を用いて，免疫組織化学的染色を行ったところ，抗 A1 抗体（N 末認識抗体）への反応はエナメル基質全体に認められ，基質の石灰化とともに徐々に消失し，エナメル基質成熟期後期には認められなくなった。一方抗 A4 抗体（C 末認識抗体）に対する反応はエナメル基質表層に限局し，エナメル基質成熟期後期に至っても継続して認められた。

以上の結果はアメロブラスチンが爬虫類にも存在し，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，爬虫類と哺乳類に共通の機能を保持しながら進化してきた分子であることを示唆している。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座大嶋 隆教授に深く感謝いたします。

また本研究の遂行にあたり、直接御指導ならびに御鞭撻を賜りました口腔分子感染制御学講座新谷誠康助教授、顎口腔病因病態制御学講座豊澤 悟講師に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究に対して御理解、御協力を頂きました口腔分子感染制御学講座（小児歯科学講座）、顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学講座）の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* New York, Wiley
- Begue-Kirn C., Krebsbach P.H., Bartlett J.D., Butler W.T. (1998) Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* 106: 963-70.
- Bosshardt D.D. and Nanci A. (1998) Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 46: 135-42.
- Cerny R., Slaby I., Hammarstrom L., Wurtz T. (1996) Novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11: 883-91.
- Conne, B., Stutz A., Vassalli, J.D. (2000) The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 6: 637-41.
- Dhamija S., Liu Y., Yamada Y., Snead M.L., Krebsbach P.H. (1999) Cloning and characterization of the murine ameloblastin promoter. *J Biol Chem* 274: 20738-43.

- Ferguson, M. W. (1981) Review: The value of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) as a model for research in craniofacial development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1: 123-44.
- Fincham A.G., Moradian-Oldak J., Simmer J.P. (1999) The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 126: 270-99.
- Fong C.D., Cerny R., Hammarstrom L., Slaby I. (1998) Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1: 324-30.
- Fong, C.D., Slaby I., Hammarstrom L. (1996) Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J Bone Miner Res* 11: 892-8.
- 福本敏, 福本恵美子, 斉藤幹, 山田亜矢, 釜崎陽子, 藤原卓 (2003) アメロブラスチンの細胞接着ドメインの同定 歯基礎誌 45: 286
- Gilbert, D.G. (1989) DottyPlot: <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio>
- Gilbert, D.G. (1995) SeqPup: <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio>
- Halstead L.B. (1969) Calcified tissues in the earliest vertebrates. *Calcif Tissue Res* 3: 107-24.
- 後藤仁敏, 大泰司紀之編(1986)歯の比較解剖学, 医歯薬出版株式会社, 東京

- Hu C.C., Fukae M., Uchida T., Qian Q., Zhang C.H., Ryu O.H., Tanabe T., Yamakoshi Y., Murakami C., Dohi N., Shimizu M., Simmer J.P. (1997) Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res* 76: 648-57.
- Hu J.C. and Yamakoshi Y. (2003) Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 387-98.
- Huysseune A. and Sire J.Y. (1998) Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. *Eur J Oral Sci* ;106 Suppl 1: 437-81
- Imanishi T. (1995) Dendromaker;
<http://www.cib.nig.ac.jp/dda/timanish/dendromaker>
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) Efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-8.
- Jernvall J. and Thesleff I. (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92: 19-29.
- Kimura M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, Cambridge University Press
- Kozak M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857-72.

- Krebsbach P.H., Lee S.K., Matsuki Y., Kozak C.A., Yamada K.M., Yamada Y. (1996) Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 271: 4431-5.
- Kyte J. and Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lee S.K., Kim S.M., Lee Y.J., Yamada K.M., Yamada Y., Chi J.G. (2003) The structure of the rat ameloblastin gene and its expression in amelogenesis. *Mol Cells* 15: 216-25.
- Lee S.K., Krebsbach P.H., Matsuki Y., Nanci A., Yamada K.M., Yamada Y. (1996) Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *Int J Dev Biol* 40: 1141-50.
- Li W.H., Wu C.I., Luo C.C. (1985) A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2: 150-74.

- MacDougall M., Simmons D., Gu T.T., Forsman-Semb K., Mardh C.K., Mesbah M., Forest N., Krebsbach P.H., Yamada Y., Berdal A. (2000) Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci* 08: 303-10.
- McIntosh J.E., Anderton X., Flores-De-Jacoby L., Carlson D.S., Shuler C.F., Diekwisch T.G. (2002) Caiman periodontium as an intermediate between basal vertebrate ankylosis-type attachment and mammalian "true" periodontium. *Microsc Res Tech* 59: 449-59.
- Murakami C., Dohi N., Fukae M., Tanabe T., Yamakoshi Y., Wakida K., Satoda T., Takahashi O., Shimizu M., Ryu O.H., Simmer J.P., Uchida T. (1997) Immunochemical and immunohistochemical study of the 27- and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. *Histochem Cell Biol* 107: 485-94.
- Nanci A., Zalzal S., Lavoie P., Kunikata M., Chen W., Krebsbach P.H., Yamada Y., Hammarstrom L., Simmer J.P., Fincham A.G., Snead M.L., Smith C.E. (1998) Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 46: 911-34.

- Osborn J.W. and Hillman J. (1979) Enamel structure in some therapsids and mesozoic mammals. *Calcif Tissue Int* 29: 47-61.
- Paine M.L., Krebsbach P.H., Chen L.S., Paine C.T., Yamada Y., Deutsch D., Snead M.L. (1998a) Protein-to-protein interactions: criteria defining the assembly of the enamel organic matrix. *J Dent Res* 77: 496-502.
- Paine C.T., Paine M.L., Snead M.L. (1998b) Identification of tuftelin- and amelogenin-interacting proteins using the yeast two-hybrid system. *Connect Tissue Res.* 38: 257-67; discussion 295-303.
- Paine M.L., Wang H.J., Luo W., Krebsbach P.H., Snead M.L. (2003) A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem* 278: 19447-52.
- Paine M.L., White S.N., Luo W., Fong H., Sarikaya M., Snead M.L. (2001). Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol* 20: 273-92.
- Robinson C., Brookes S.J., Shore R.C., Kirkham J. (1998) The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1: 282-91.

- Rouault J.P., Samarut C., Duret L., Tessa C., Samarut J., Magaud J.P. (1993) Sequence analysis reveals that the BTG1 anti-proliferative gene is conserved throughout evolution in its coding and 3' non-coding regions. *Gene* 129: 303-6.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-25
- Sasaki T. and Higashi S. (1983) Morphological, tracer and cytochemical study of the role of the papillary layer of the rat-incisor enamel organ during enamel maturation. *Arch Oral Biol* 28: 201-10.
- Satchell P.G., Shuler C.F., Diekwisch T.G. (2000) True enamel covering in teeth of the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*. *Cell Tissue Res* 299: 27-37.
- Shintani S., O'hUigin C., Toyosawa S., Michalova V., Klein J. (1999) Origin of gene overlap: the case of TCP1 and ACAT2. *Genetics* 152: 743-54.
- Simmer J.P. and Hu J.C. (2001) Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 65: 896-905.

- Simmons D., Gu T.T., Krebsbach P.H., Yamada Y., MacDougall M. (1998)
Identification and characterization of a cDNA for mouse
ameloblastin. *Connect Tissue Res* 39: 3-12; discussion 63-7.
- Smith M.M. and Coates M.I. (1998) Evolutionary origins of the vertebrate
dentition: phylogenetic patterns and developmental evolution.
Eur J Oral Sci 106 Suppl 1: 482-500
- Termine J.D., Belcourt A.B., Christner P.J., Conn K.M., Nylén M.U. (1980)
Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix
proteins. I. Principal molecular species in developing bovine
enamel. *J Biol Chem* 255: 9760-8.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.
(1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies
for multiple sequence alignment aided by quality analysis
tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
- Toyosawa S., Fujiwara T., Ooshima T., Shintani S., Sato A., Ogawa Y.,
Sobue S., Ijuhin N. (2000) Cloning and characterization of the
human ameloblastin gene. *Gene* 256: 1-11.
- Toyosawa S., O'hUigin C., Figueroa F., Tichy H., Klein J. (1998)
Identification and characterization of amelogenin genes in
monotremes, reptiles, and amphibians. *Proc Natl Acad Sci U S*
A 95: 13056-61.

- Toyosawa S., O'hUigin C., Tichy H., Klein J. (1999) Characterization of dentin matrix protein 1 gene in crocodilia. *Gene* 234: 307-14.
- Uchida T., Fukae M., Tanabe T., Yamakoshi Y., Satoda T., Murakami C., Takahashi O., Shimizu M. (1995) Immunochemical and immunocytochemical study of a 15KDa non-amelogenin and related proteins in the porcine immature enamel: Proposal of a new group of enamel proteins 'sheath proteins'. *Biomed Res* 16: 131-140.
- Uchida T., Murakami C., Dohi N., Wakida K., Satoda T., Takahashi O. (1997) Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem* 45: 1329-40.
- Uchida T., Murakami C., Wakida K., Dohi N., Iwai Y., Simmer J.P., Fukae M., Satoda T., Takahashi O. (1998) Sheath proteins: synthesis, secretion, degradation and fate in forming enamel. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1: 308-14.

- Wedemeyer N., Schmitt-John T., Evers D., Thiel C., Eberhard D., Jockusch H. (2000) Conservation of the 3'-untranslated region of the Rab1a gene in amniote vertebrates: exceptional structure in marsupials and possible role for posttranscriptional regulation. *FEBS Lett* 477: 49-54.
- Wickens M., Anderson P., Jackson R.J. (1997) Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev* 7: 220-32.
- Yaffe D., Nudel U., Mayer Y., Neuman S. (1985) Highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mRNAs coding for homologous proteins in distantly related species. *Nucleic Acids Res* 13: 3723-37.

```

1 AAAGGGAATTCACAAATGATTGCCATACAAAACCAAGACTTTCATCTTGTGAAGGTTTTTGAGACTTGGATCTGCAGGTTTC 80
81 TAAAAAAGCAGCTCAAGCCAGCTAATCAAGGTAGAGCTTGTGAAAT 125

126 ATG AAT GTC TGG ATG CTG ACG TTA TGC CTC CTA GGC ACA GGG TTT GCT TTG CCA ATG TAC 185
1 M N V W M L T L C L L G T G F A L P M Y 20

186 CCT CAG CAT ACT GGG ACA CGT GGA ATG GCT AGT ATG AGC CTT GAG ATG AGA CAA TAT GGT 245
21 P Q H T G T R G M A S M S L E M R Q Y G 40
← AMBC1 →
246 CGA CAA AAC ATG AAC ATG CTT CCA CAG TAT GGT CGG TAC GAC TAT GGT GAA CCA TTT AAT 305
41 R Q N M N M L P Q Y G R Y D Y G E P F N 60
← AMBC2 →
306 TCA GTC TGG CTG CAT GGT CTT CTC CCA CCA CAC TCT TCA TTT CCA TGG TTA CAG CAA AGA 365
61 S V W L H G L L P P H S S F P W L Q Q R 80

366 CCA CAA GAA CAT GAG ACC CAA CAG TAT GAA TAT GCA ATG CCT GTA CAT CCA CCA CCT CTG 425
81 P Q E H E T Q Q Y E Y A M P V H P P P L 100

426 CCA TCG CTG CAG ACC CCA CTT CAG CCA CAG CAA CCA AGA TTA CAG GCT CAG AAT CCT TCC 485
101 P S L Q T P L Q P Q Q P R L Q A Q N P S 120

486 TTG CGC TCA ACG CTG CCC ACA AAG CAA GGT CAA ATA CAG CTG AAC GAA GCG TTG CTG CCC 545
121 L R S T L P T K Q G Q I Q L N E A L L P 140

546 GTC CAA GTG GGA CAG CCA CCA CTG CAG CAA GGA GAA CTG CCT GGG ATT CAA CAA CAG CTG 605
141 V Q V G Q P P L Q Q G E L P G I Q Q Q L 160

606 ATA CCA GCA GAC AAG CAG CTA CAG TTA CCA GCG CTG GAA TAT TCA GGG CAT TTG GGT CAG 665
161 I P A D K Q L Q L P A L E Y S G H L G Q 180

666 GTG ATG TAC CCA ATT GTC CAT CAG TTA GTC CAC CAA GGT CCA ATG CAA CCA CAA CAG CAA 725
181 V M Y P I V H Q L V H Q G P M Q P Q Q Q 200

726 CCA GCA TTG CAT CCT GCC CTT TTT TAC ATG TCC TAT GCA GCA AAC CAA GGA GGT GCT CCC 785
201 P A L H P A L F Y M S Y A A N Q G G A P 220
← AMBC7 →
786 GCT AGG CTT GGC ATA GTG AGT TCA GAA GAA ATG CTG GGA GGC AGA GGT GGG GTA CCC GCC 845
221 A R L G I V S S E E M L G G R G G V P A 240

846 TAC GGT GCC ATG ATT CCT GGA TTC AGA GGG ATG CCT CAG GAC CCA GCC CTC CAG GGA GAT 905
241 Y G A M I P G F R G M P Q D P A L Q G D 260

906 TTC ACA ACG GAA GAT GAT AAC CCT GCT ACA GCA CAT AAT CCA GCC ATC CAA GGA GGC GCC 965
261 F T T E D D N P A T A H N P A I Q G G A 280

966 AAC CAG GGC TTC TCA AGA GGC TCC CGA TTT CCA GCA GTG AAT CGT GCA GGC CAT GGA AGT 1025
281 N Q G F S R G S R F P A V N R A G H G S 300

1026 GCC ATA CTT CTT CCA GAT GGG ACC CCA GCA GGA CAC GAG GGT TTT TTG CCA AAT ATT AAC 1085
301 A I L L P D G T P A G H E G F L P N I N 320

1086 GAT ATG CCA GGC CAA GGG GTC AAT CCT GTT GGT CAG AGA GGA ACT CCA GAG GTG ACT CCA 1145
321 D M P G Q G V N P V G Q R G T P E V T P 345
← AMBC6 →
1146 ACT GCT ACA GCC CCA GAA TTA ACA CAG GGT ATC CCT GAC AGC TTT ATG ACC TTT GGT GCT 1205
341 T A T A P E L T Q G I P D S F M T F G A 360

1206 GAG GGC ACA GTA CCC CTG GGT ATA CAG AAG GAA GTG ACC GCG GAC CCT ACC ATG TTC CCA 1265
361 E G T V P L G I Q K E V T A D P T M F P 380

1266 GAA GCT CAG CAT ACG CTC ATG GCA GGA AAT GGG GCT GAA CAG CCA CAG GTT ATG CAA GAT 1325
381 E A Q H T L M A G N G A E Q P Q V M Q D 400

1326 GTC TGG CAT TTC CAA GAG CCC TGA 1349
401 V W H F Q E P * 408

1350 GCATACTTTGGAACATACTCATATCATTCATGTATACCCCTATGCCGTGATGCACTGGCCAACAAATCTGTTTATCTGCTT 1429
1430 CTGTGGCATTAGCAATAAATGTTTATGACAGCTGTGAAATGCTGGTGCAACTTTTATTTGTCTCTTTCC 1509
1510 CAAATGAGAAAGAAAAAGCTCTCTTCACATTCAGTGAATTAATAGTTCAACTAAATCCTGCAGTTAATACCATCAGTT 1589
1590 TCCCCCTCCCGCTAGAAATCAGTCAAATCCAGGTGTTTGTGGCGTGTCCCTGAGATAAACCAGAAAAATGTATAAC 1669
1670 AATTATTTCTTTTAAACTTTGCGCTTTAGAGAACGTGATGCACTTCTGATAGACATATTGTTTCATTCAAACAGTTAAC 1749
1750 TGGTGTATTAGGCCCAACCCCTGGCTTTGTTAAACATGTTGGTCTACTGCACTGAGAGTTAGTTAGTATATAATAAAC 1829
1830 TTCTATATAACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1909

```

図1 ワニアメロプラスチンcDNA塩基配列および推定アミノ酸配列
(GenBank accession no. AY043290)

- 1-125 5' Untransrated Region (UTR) 太字 異なるクローンで認められた48塩基の欠失
- 126-1349 コード領域 二重下線 哺乳類アメロプラスチンと高度な相同性が認められる領域
- 1350-1909 3' UTR 下線 ポリアデニレーションシグナル
- * 終止コドン 矢印 cDNA塩基配列の決定に用いたプライマー
- 点線 シグナルペプチド (アミノ酸はIUPAC-IUBによる一文字表記)

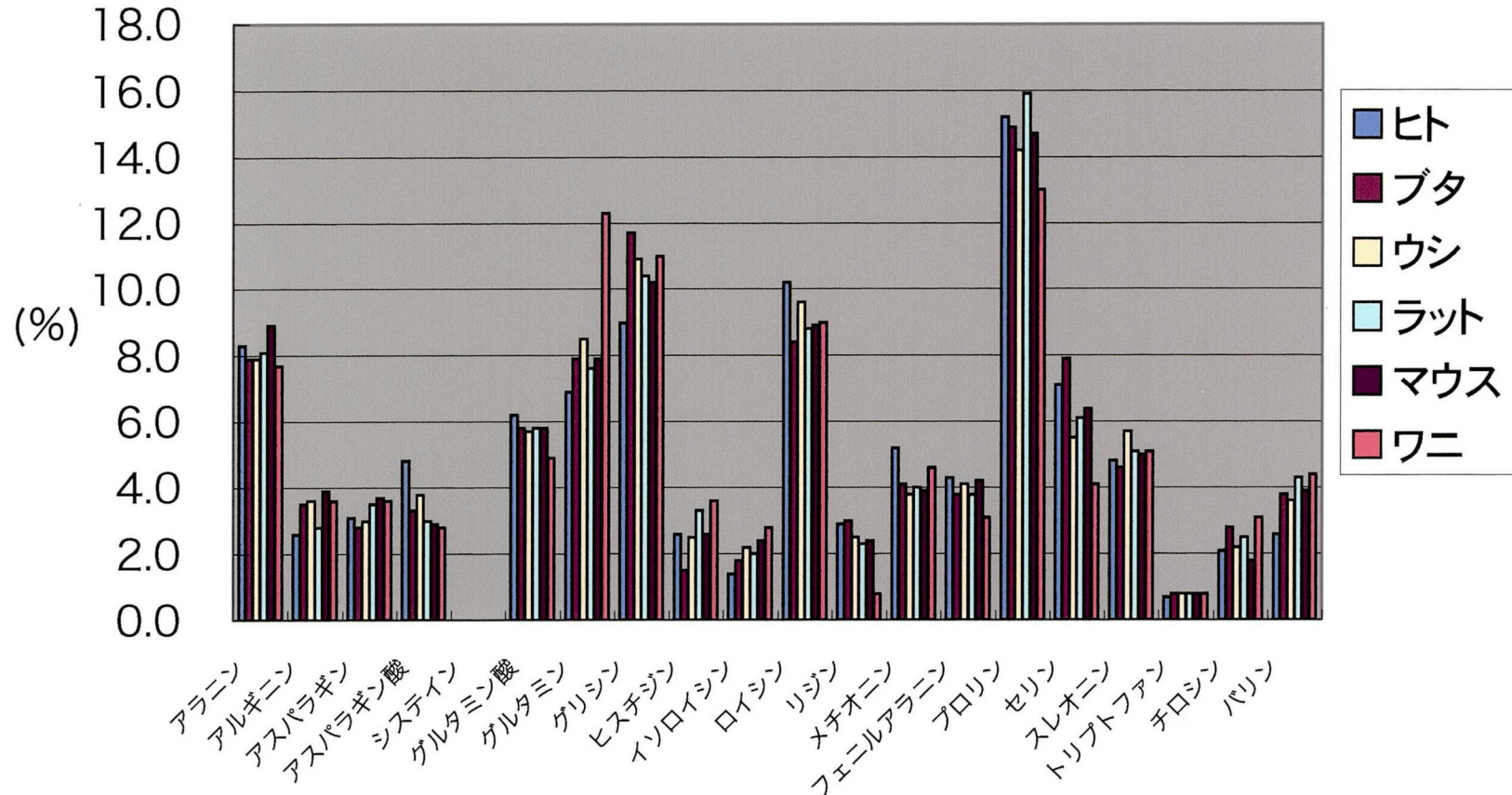


図2 アメロブラスチンの推定アミノ酸構成比率

アミノ酸残基を横軸に、アメロブラスチンタンパク中に占める割合を縦軸に示す。

ヒトはToyosawaら (2000), ブタはHuら (1997), ウシ (GenBank accession no. AF157019), ラットは Krebsbachら (1996), マウスはSimmonsら (1998) のアメロブラスチン遺伝子の推定アミノ酸配列を参照した。

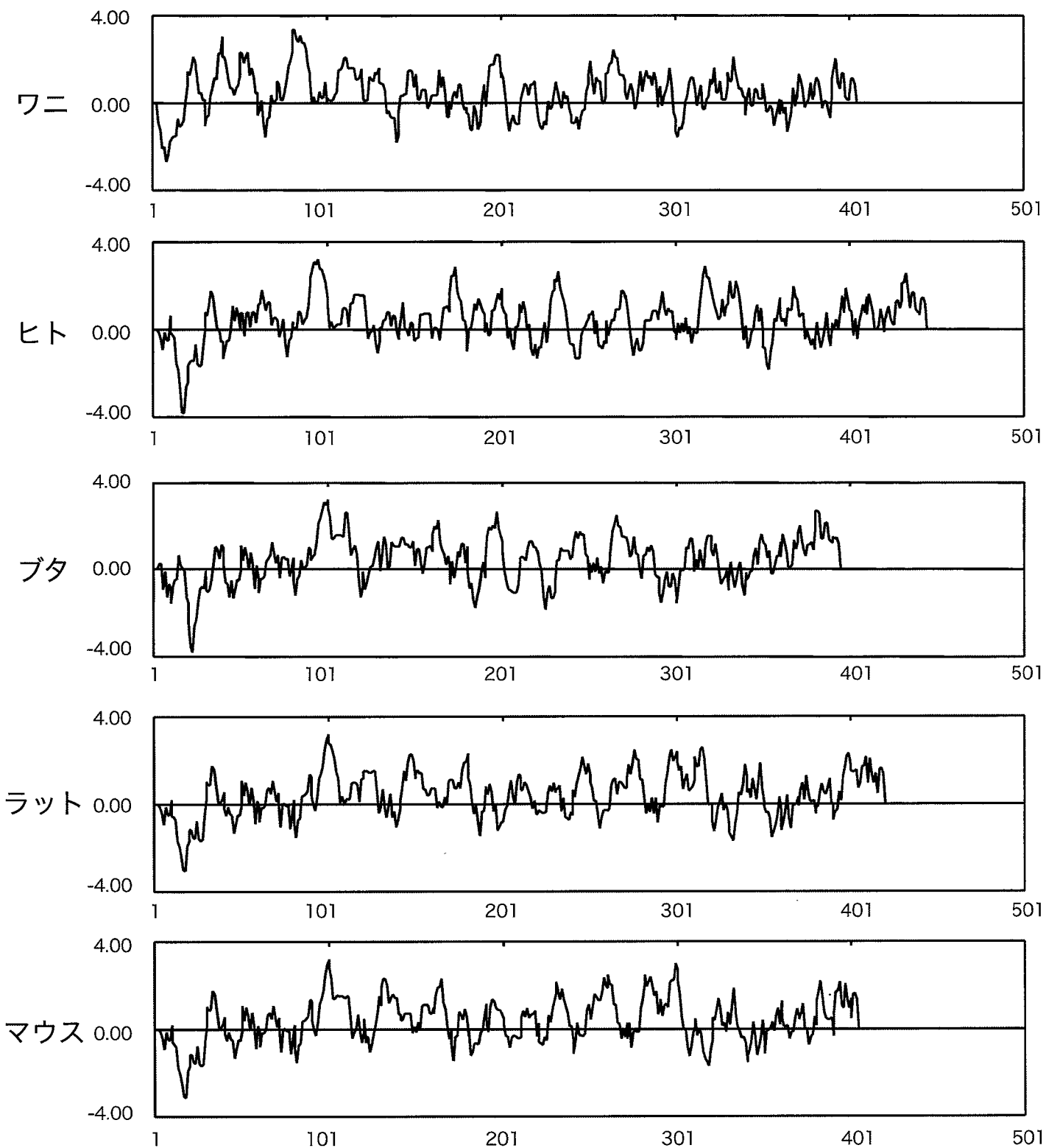


図3 アメロブラスチンの疎水性分析

横軸；翻訳開始コドンから数えたアミノ酸残基の番号

縦軸；+は親水性を，-は疎水性を示す

ヒト (Toyosawaら, 2000) , ブタ (Huら, 1997) , ラット (Krebsbachら, 1996)
 マウス (Simmonsら, 1998) より作成

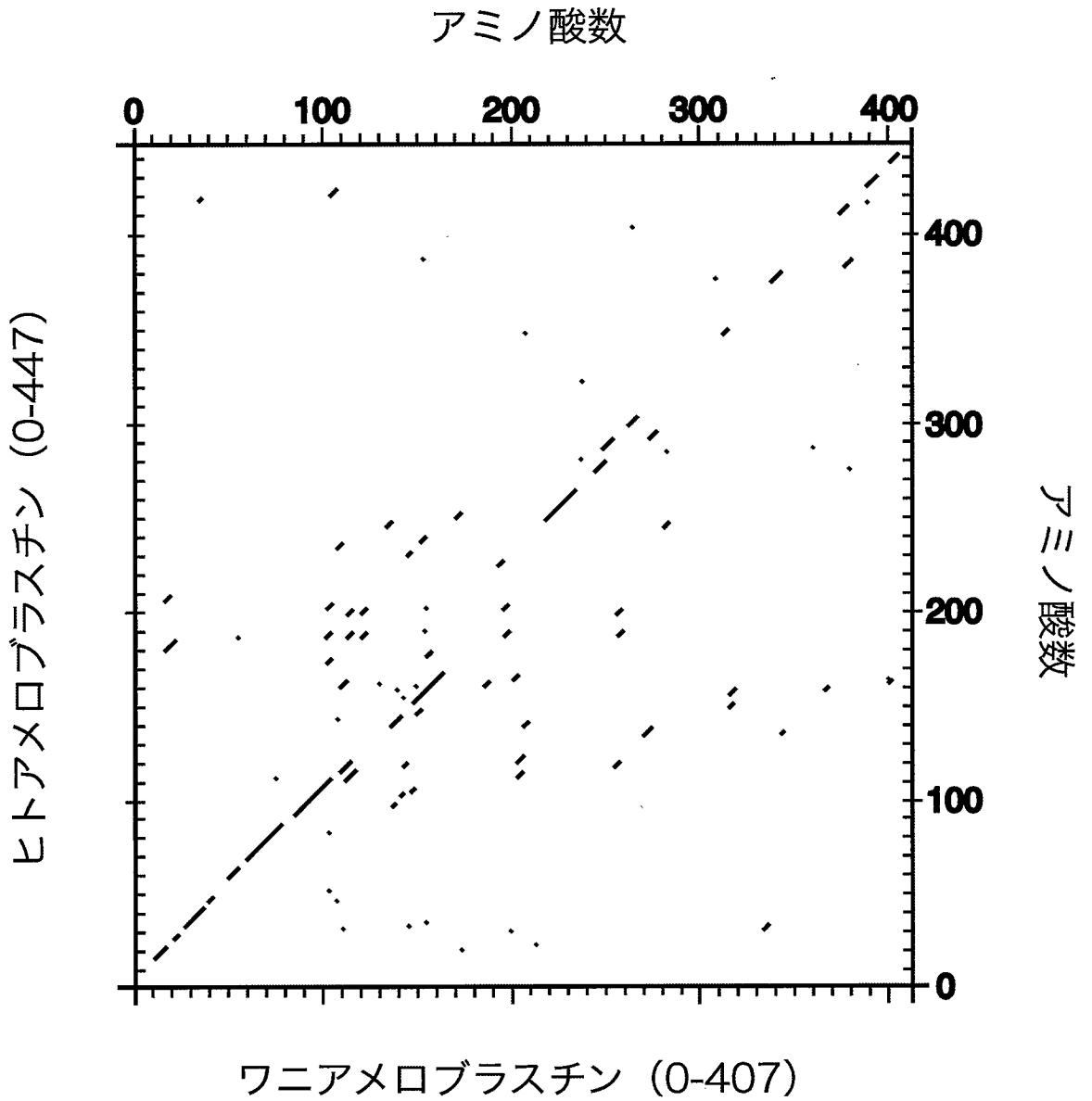


図4 ワニーヒトアメロブラスチン推定アミノ酸配列によるドットマトリクス分析

7つのアミノ酸残基中4つが一致する部位をポイントとして示してある。

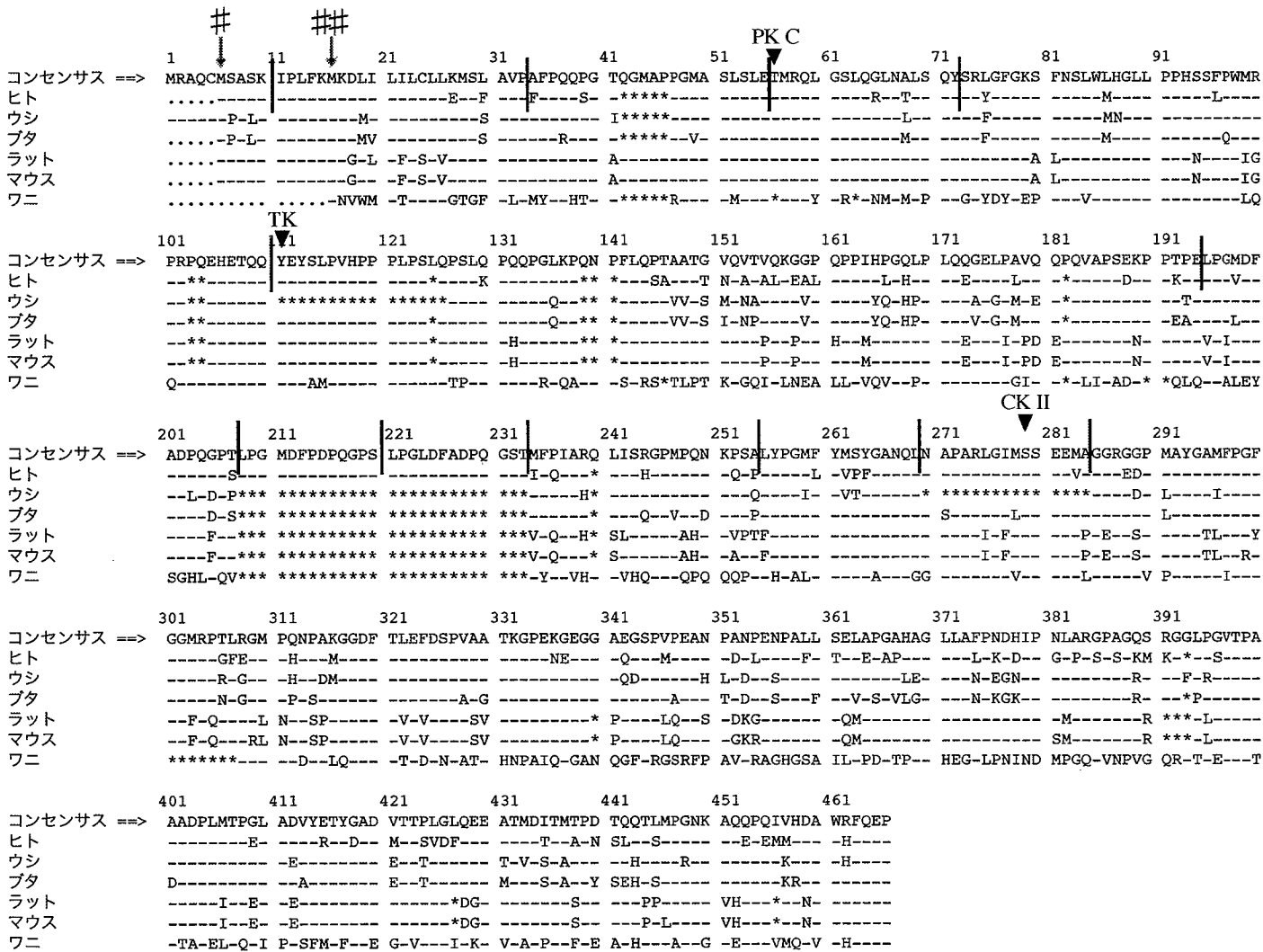


図5 アメロブラスチン推定アミノ酸配列によるマルチプルアライメント

リン酸化サイト

—; コンセンサス配列と一致する部位

PK C; プロテインカイネースC

*; 相当するアミノ酸が存在しない部位

TK; チロシンカイネース

#; これまでに推定された開始コドン

CK II; カゼインカイネースII

##; 本研究にて真の開始コドンと推定されたメチオニン

ヒトはToyosawaら (2000), ブタはHuら (1997), ラットはKrebsbachら (1996), マウスはSimmonsら (1998) の結果より作成した。

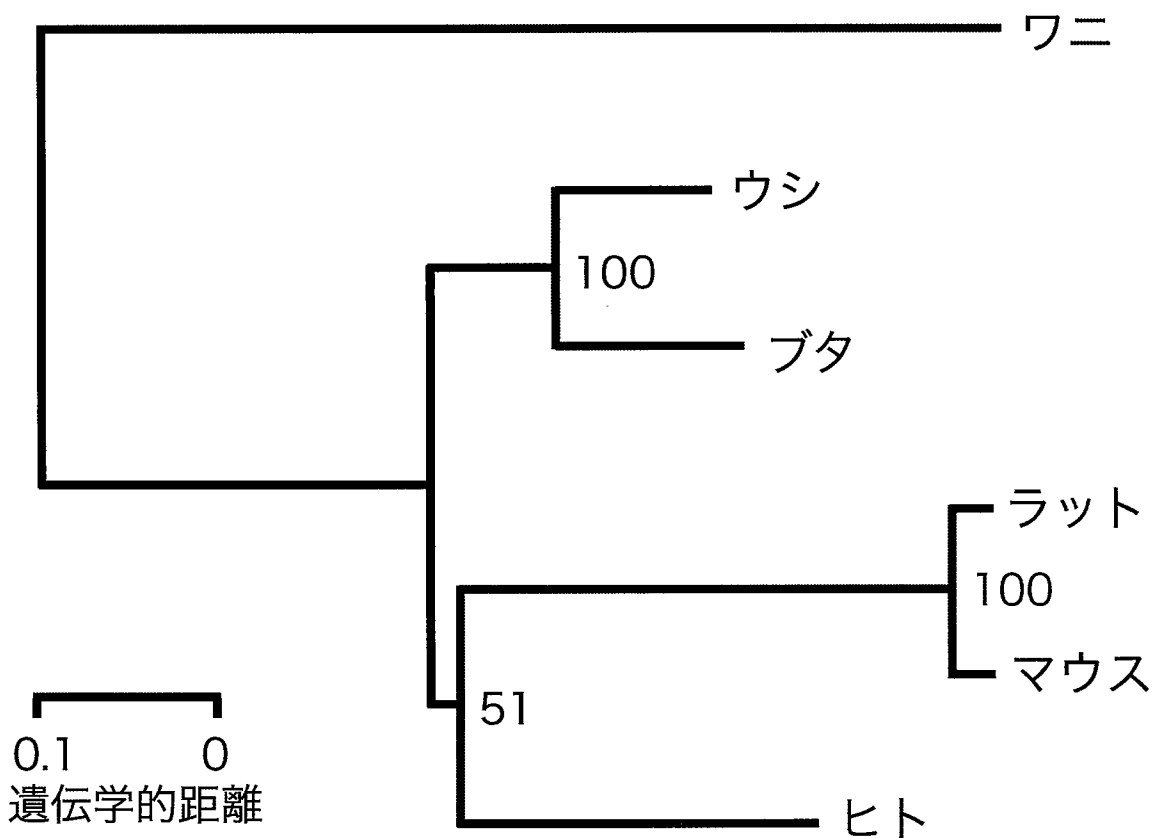


図6 アメロブラスチンの推定アミノ酸配列による分子系統樹

推定アミノ酸配列により近隣結合法を用いて作成した分子系統樹

枝内の数字はブートストラップ確率 (%) を示し、その系統樹の信頼性を示す。

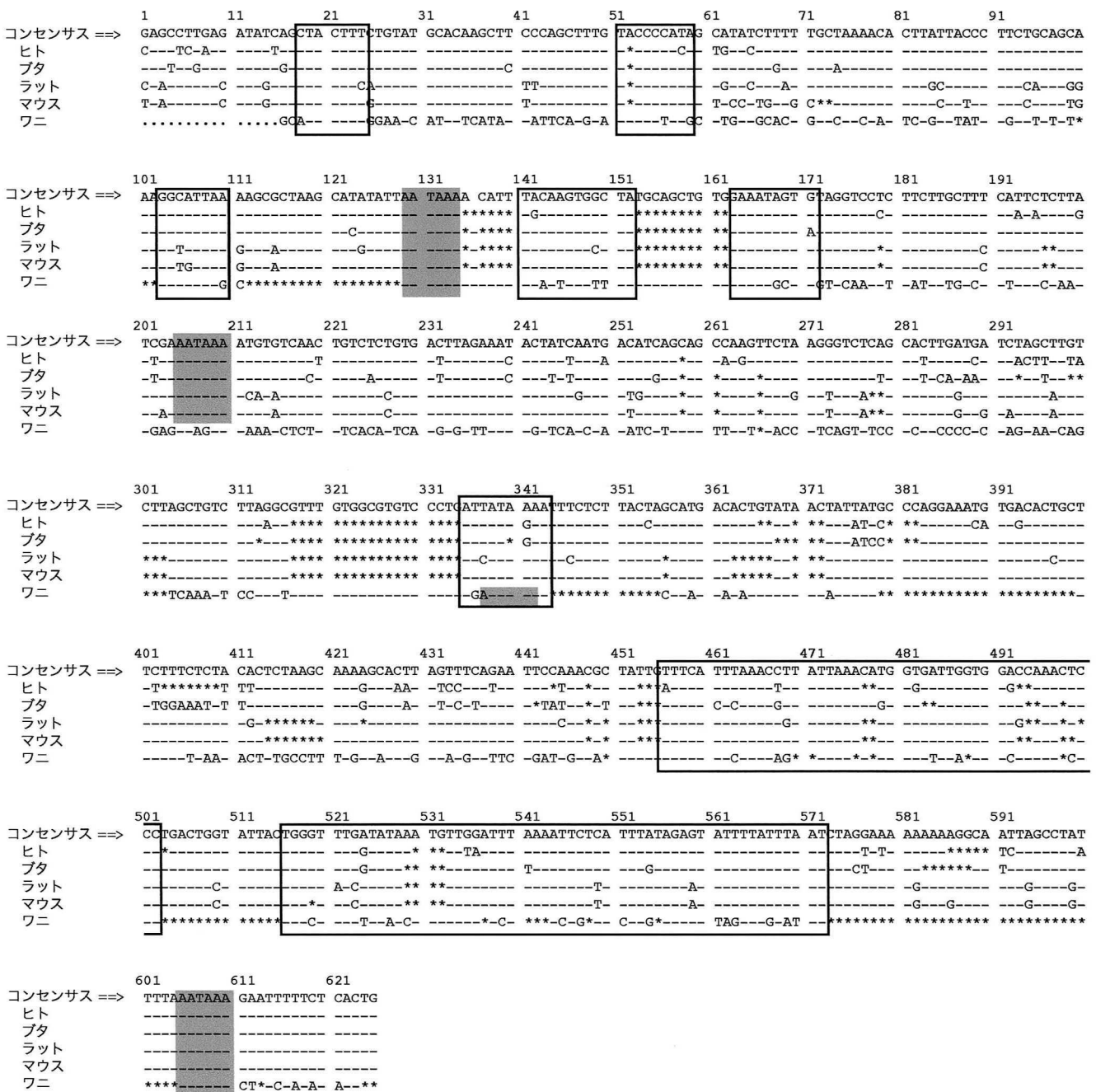


図7 アメロブラスチン3'UTR領域のマルチプルアライメント

- ; コンセンサス配列と一致する部位
- *; 相当するアミノ酸が存在しない部位
- 黒枠; 高度に塩基配列が保存されている部位
- 陰影部; 推定されるpoly-Aシグナル

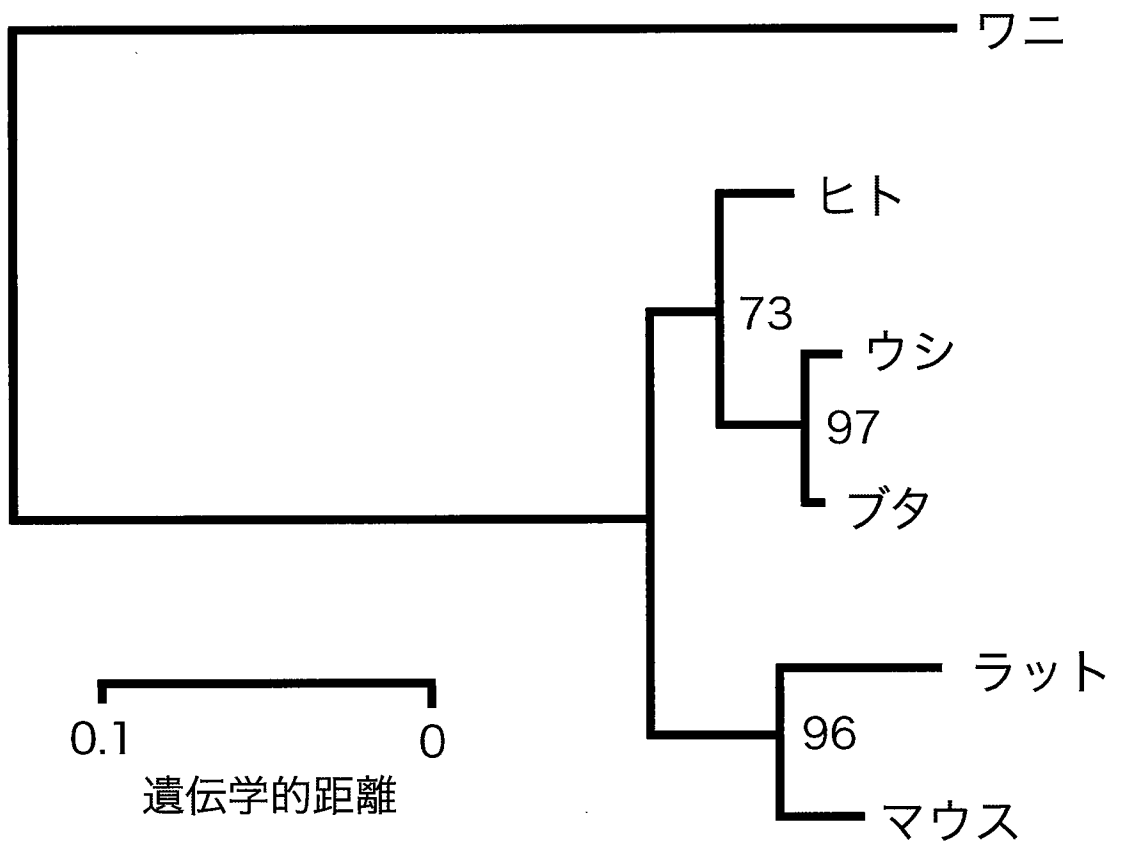
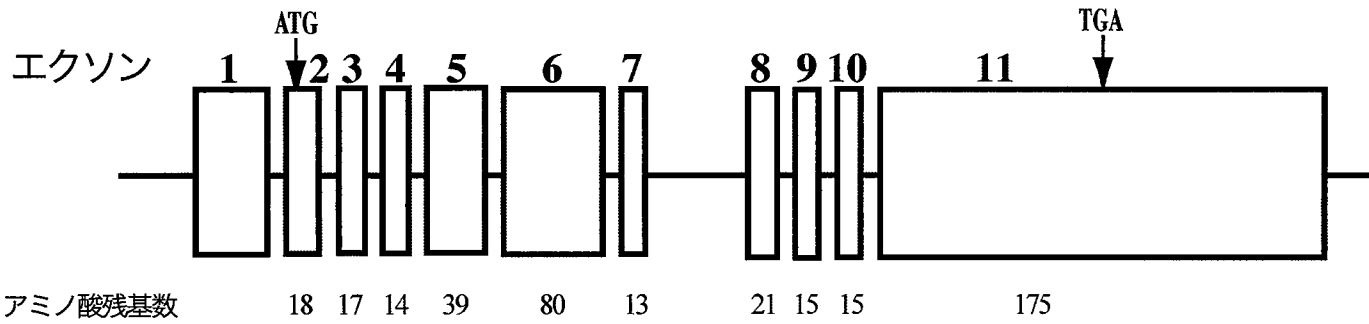


図8 アメロブラスチン3'UTR塩基配列による分子系統樹

3'UTRの塩基配列により近隣結合法を用いて作成した分子系統樹

枝内の数字はブートストラップ確率 (%) を示し、その系統樹の信頼性を示す。

ワニ



ヒト

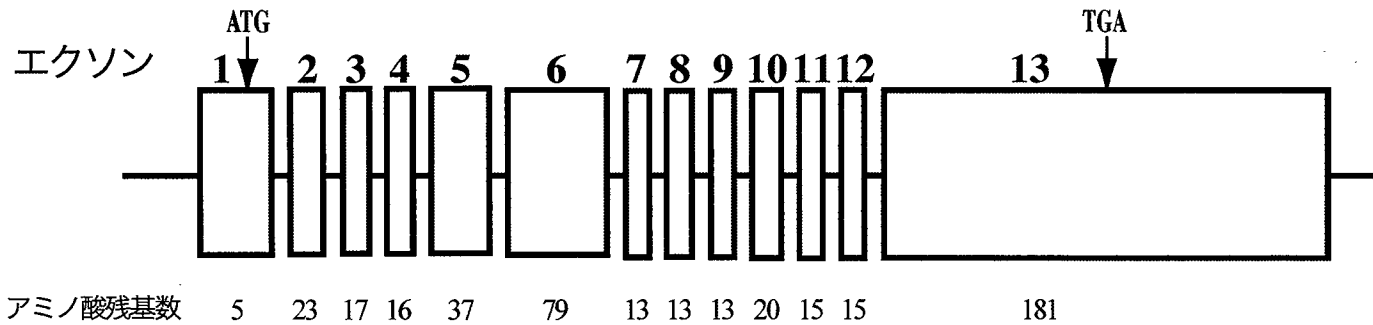


図9 ワニおよびヒトアメロブラスチン遺伝子の遺伝子構造

ヒトアメロブラスチン遺伝子の構造はToyosawaら（2000）より引用した。

黒枠; エクソン

上段の数字; エクソン番号

下段の数字; コードするアミノ酸残基数

ATG; 開始コドン

TGA; 終止コドン

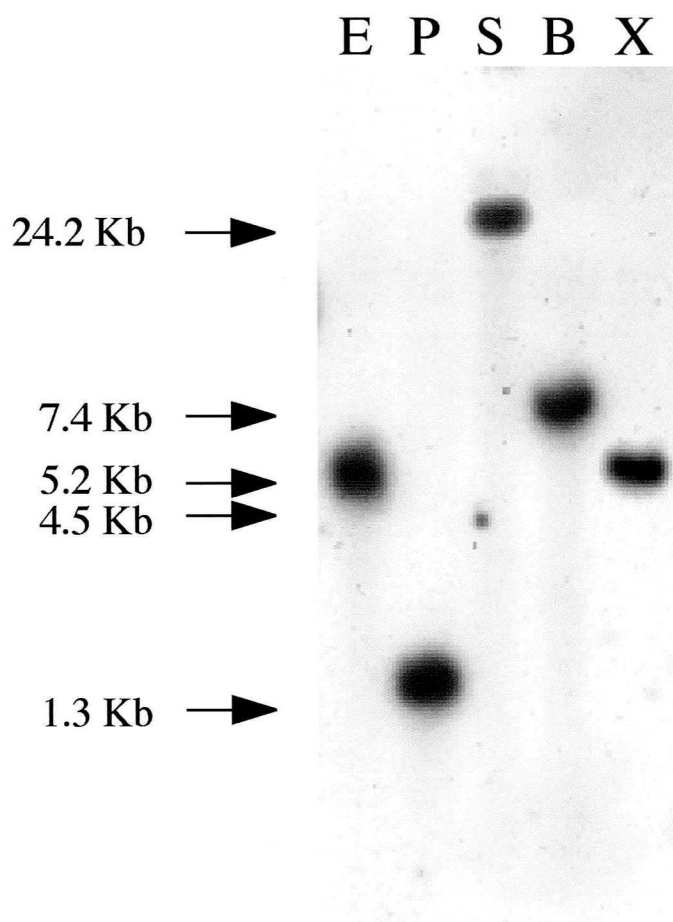


図10 ワニアメロブラスチン遺伝子のサザンブロット解析

ゲノムDNAの切断に用いた制限酵素

E; *Eco* RI, P; *Pst* I, S; *Sma* I, B; *Bgl* II, X; *Xba* I

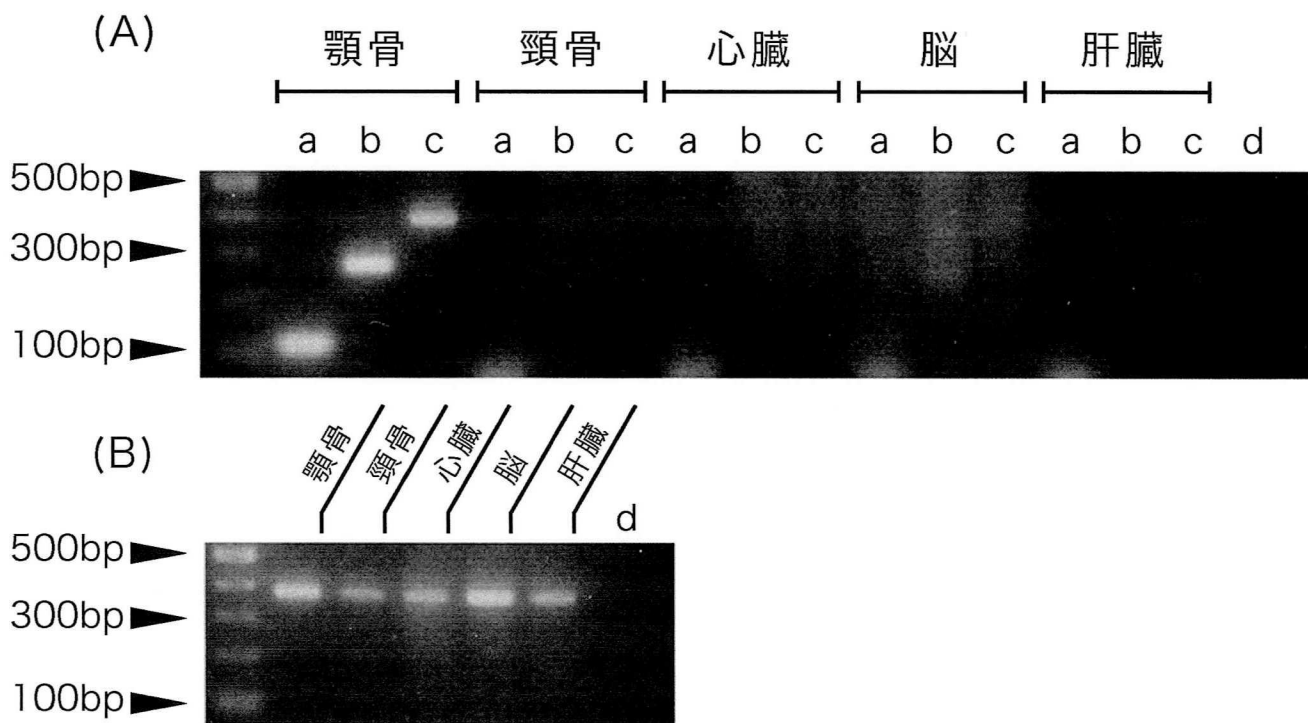


図11 ワニアメロブラスチンの各組織サンプルに対するRT-PCR

- (A) ワニアメロブラスチン特異的プライマーセットによるRT-PCR
 a; AMBC1-AMBC3, b; AMBC5-AMBC6, c; AMBC6-AMBC7
 d; ネガティブコントロール
- (B) ワニ*GAPDH*遺伝子の発現
 d; ネガティブコントロール

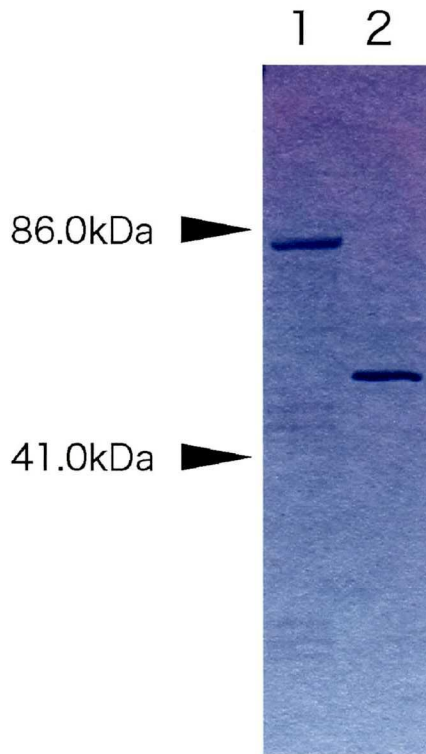


図12 リコンビナントワニアメロブラスチンのSDS-PAGE

1レーン GST-ワニアメロブラスチン融合タンパク
2レーン リコンビナントワニアメロブラスチン
(酵素処理後)

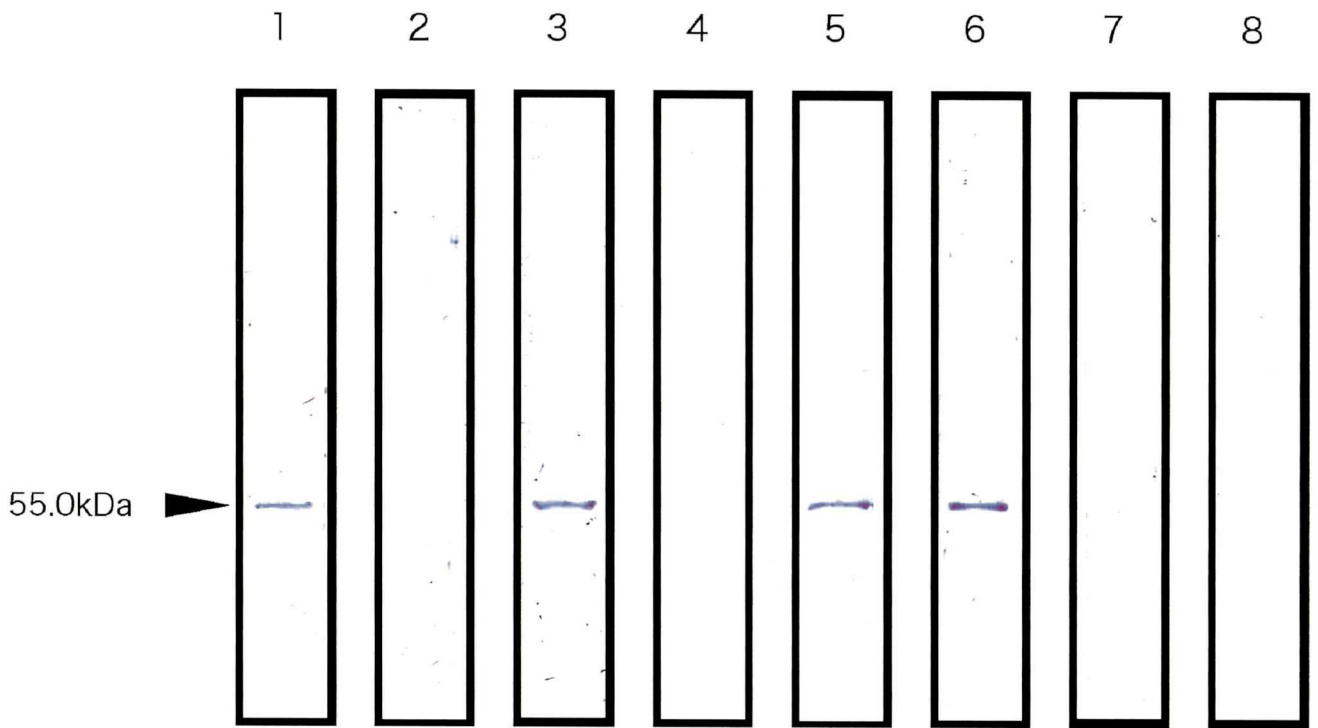


図13 抗ワニアメロブラスチン抗体の評価

- | | | | |
|------|------------------------|------|------------------------|
| 1レーン | 抗A1抗体 | 5レーン | 抗A4抗体 |
| 2レーン | 抗A1抗体+A1抗原 | 6レーン | 抗A4抗体+A1抗原 |
| 3レーン | 抗A1抗体+A4抗原 | 7レーン | 抗A4抗体+A4抗原 |
| 4レーン | 免疫前血清
(ネガティブコントロール) | 8レーン | 免疫前血清
(ネガティブコントロール) |

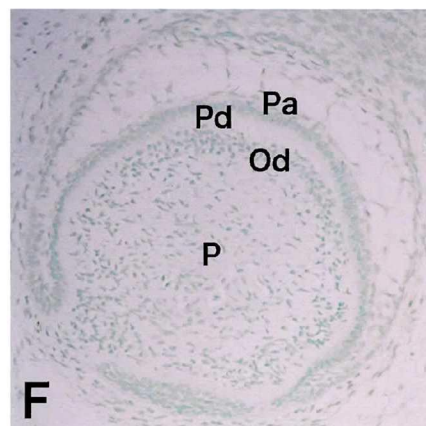
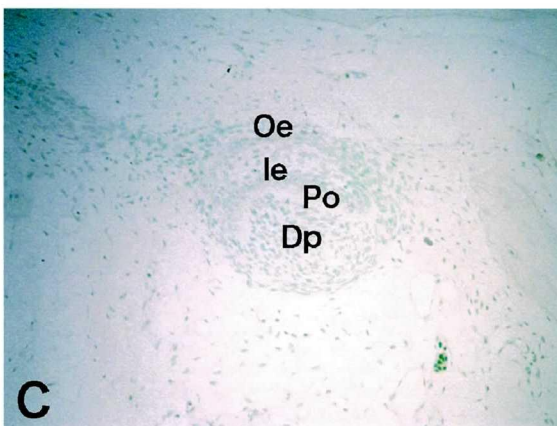
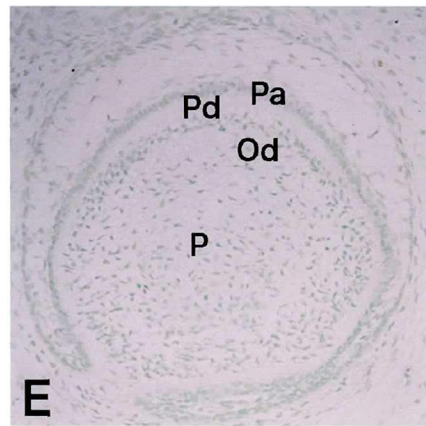
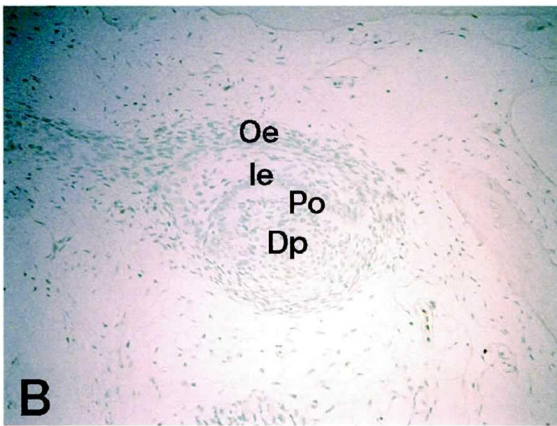
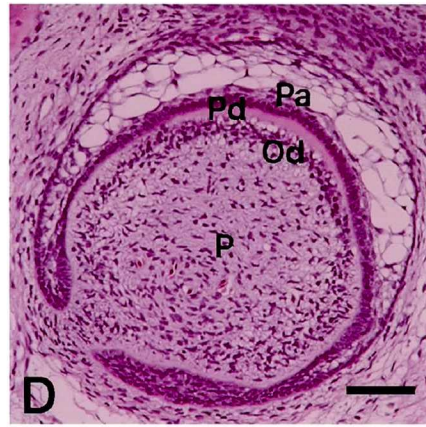
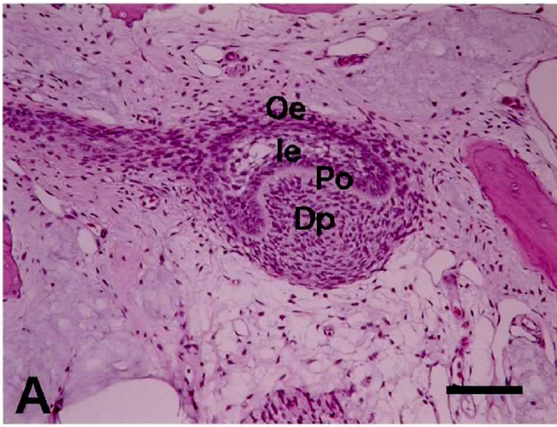


図14 エナメル基質分泌開始以前におけるアメロブラスチンの分布

A-C; 帽状期におけるワニ歯胚の連続切片
 A; HE染色像
 B; 免疫染色像 (抗A1抗体)
 C; 免疫染色像 (抗A4抗体)

D-F; 象牙質基質分泌開始期のワニ歯胚の連続切片
 D; HE染色像
 E; 免疫染色像 (抗A1抗体)
 F; 免疫染色像 (抗A4抗体)

Oe; 外エナメル上皮, Ie; 内エナメル上皮
 Po; 前象牙芽細胞, Dp; 歯乳頭細胞

Pa; 前エナメル芽細胞, Po; 象牙前質
 Od; 象牙芽細胞, P; 歯髄

スケールバー; 100 μ m

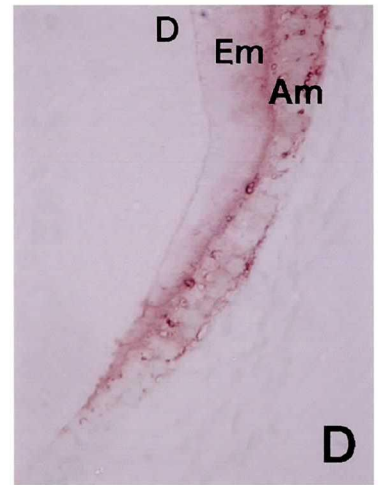


図15 エナメル基質分泌期におけるアメロブラスチンの分布

A; HE染色像 (弱拡大)

B-D; エナメル基質分泌期におけるワニ歯胚の連続切片 (A中アの拡大像)

B; HE染色像

C; 免疫染色像 (抗A1抗体)

D; 免疫染色像 (抗A4抗体)

D; 象牙質, Em; エナメル基質

Am; エナメル芽細胞

Od; 象牙芽細胞, P; 歯髄

スケールバー; 100 μ m

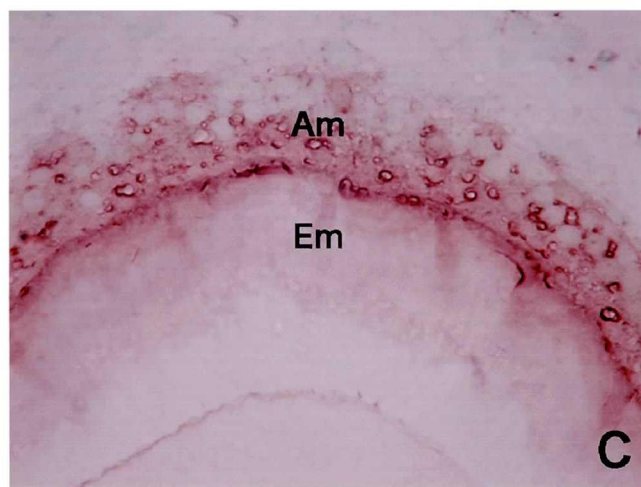
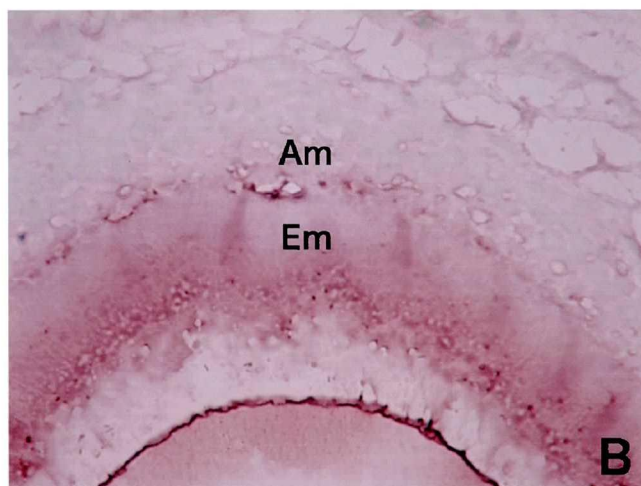
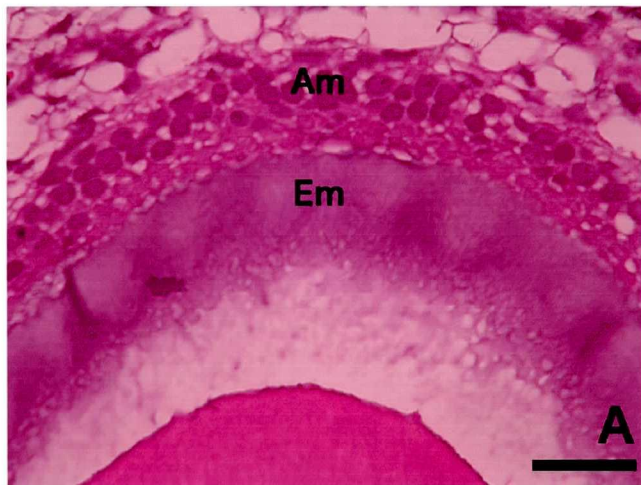


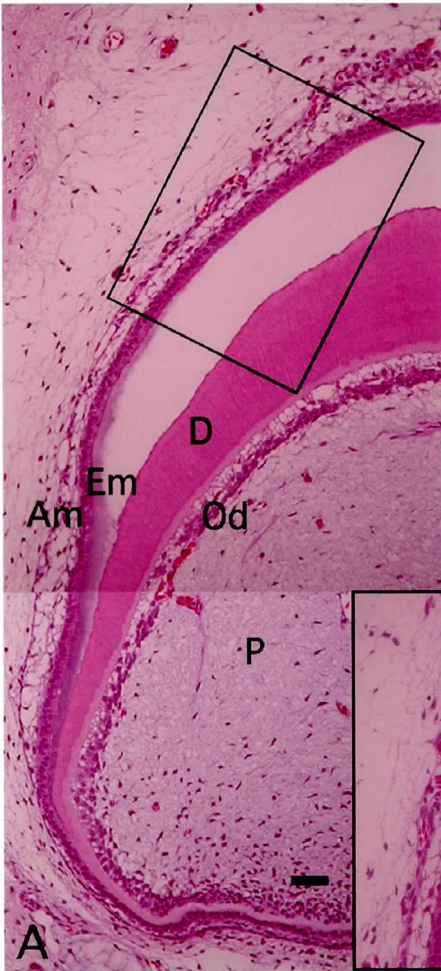
図16 エナメル基質成熟前期におけるアメロブラスチンの分布

A-C; エナメル基質成熟前期におけるワニ歯胚の連続切片 (図15A中イの拡大像)

A; HE染色像
 B; 免疫染色像 (抗A1抗体)
 C; 免疫染色像 (抗A4抗体)

Am; エナメル芽細胞
 Em; エナメル基質

スケールバー; 100 μ m



A, C, E; エナメル基質成熟期後期におけるワニ歯胚の連続切片

A, B; HE染色像

C, D; 免疫染色像 (抗A1抗体)

E, F; 免疫染色像 (抗A4抗体)

B, D, FはそれぞれA, C, E中の黒枠部の拡大

Am; エナメル芽細胞

Em; エナメル基質

D; 象牙質

Od; 象牙芽細胞

P; 歯髄

スケールバー; 50μm

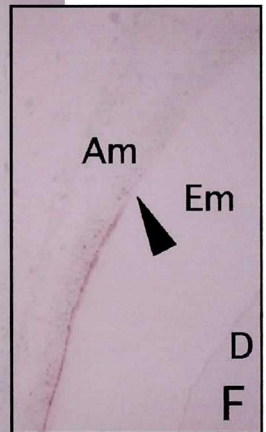
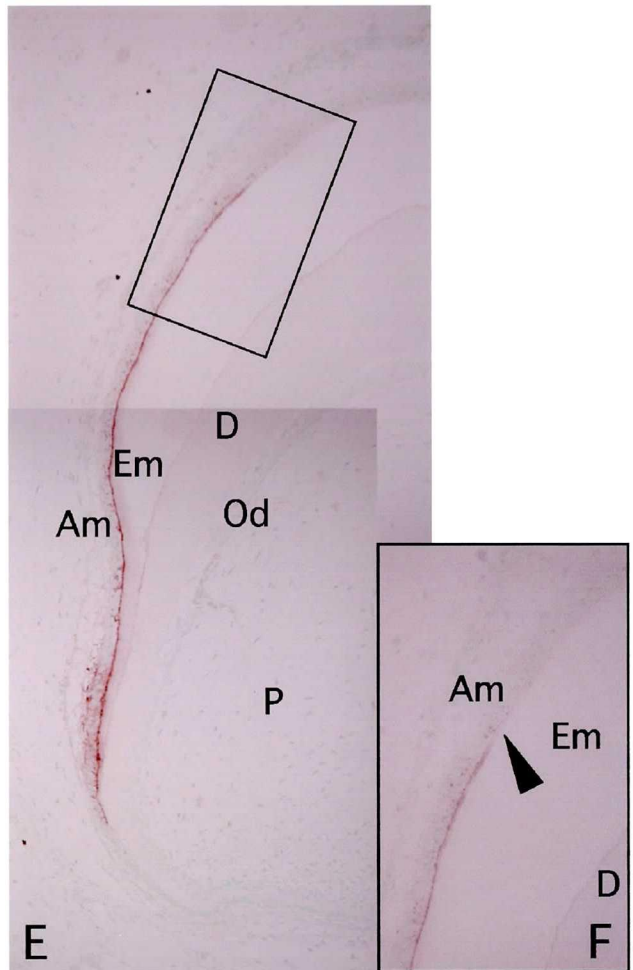
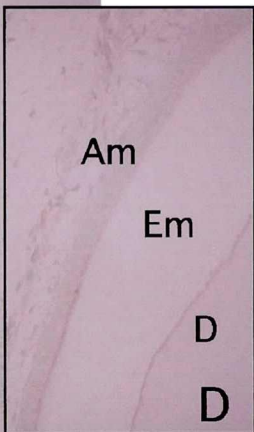
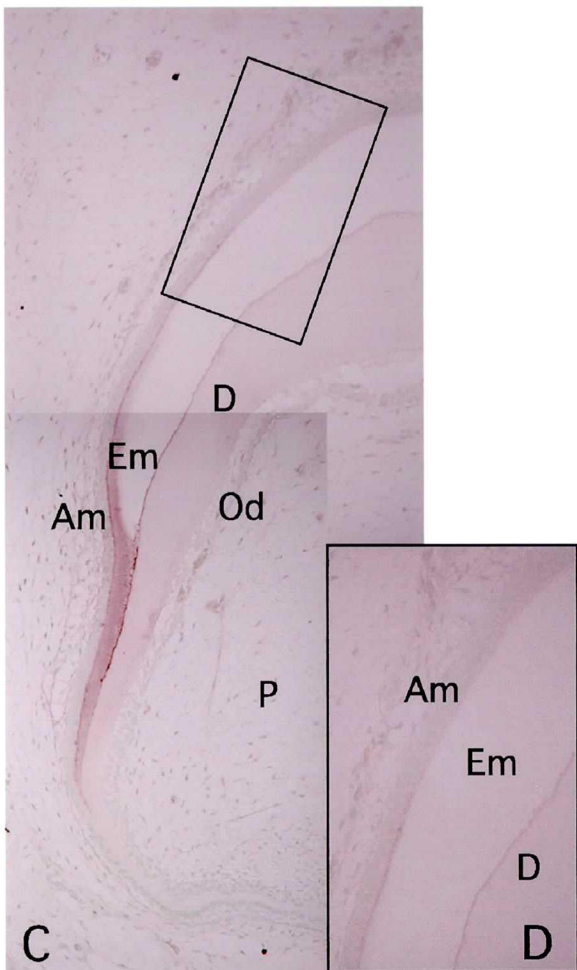


図17 エナメル基質成熟後期におけるアメロブラスチンの分布

					*	I							
ワニ	TAA	AAA	AGC	AGC	TCA	AGC	CAG	CTA	ATC	AAG	GTA	GAG	CTC
ヒト	CTG	AGG	GCA	CAG	TGC	ATG	TCA	GCA	TCT	AAG	ATT	CCA	CTT
ウシ	ATG	AGA	GCA	CAG	TGC	ATG	CCA	GCA	TTG	AAG	ATC	CCA	CTT
ブタ	CTG	AGA	GCA	CTG	TGC	ATG	CCA	GCA	TTG	AAG	ATT	CCA	CTT
ラット	CTG	GGA	GCA	CAG	TGA	ATG	TCA	GCA	TCT	AAG	ATT	CCA	CTT
マウス	CTG	GGA	GCA	CAG	TGA	ATG	TCA	GCA	TCT	AAG	ATT	CCA	CTT

	※	#	II										
ワニ	TGA	AAT	ATG	AAT	GTC	TGG	ATG	CTG	ACG	TTA	TGC	CTC	CTA
ヒト	TTC	AAA	ATG	AAG	GAC	CTG	ATA	CTG	ATC	CTA	TGC	CTC	CTG
ウシ	TTC	AAA	ATG	AAG	GAC	ATG	ATA	CTG	ATC	CTG	TGC	CTC	CTG
ブタ	TTC	AAA	ATG	AAG	GAC	ATG	GTA	CTG	ATC	CTG	TGC	CTC	CTG
ラット	TTC	AAA	ATG	AAG	GGC	CTG	CTC	CTG	TTC	CTG	TCC	CTA	GTG
マウス	TTC	AAA	ATG	AAG	GGC	CTG	ATC	CTG	TTC	CTG	TCC	CTA	GTG

図18 アメロプラスチン5'領域塩基配列のマルチプルアライメント

I; 第1 ATG ※; プリミジン基
 II; 第2 ATG #; プリン基
 ※; 終止コドン

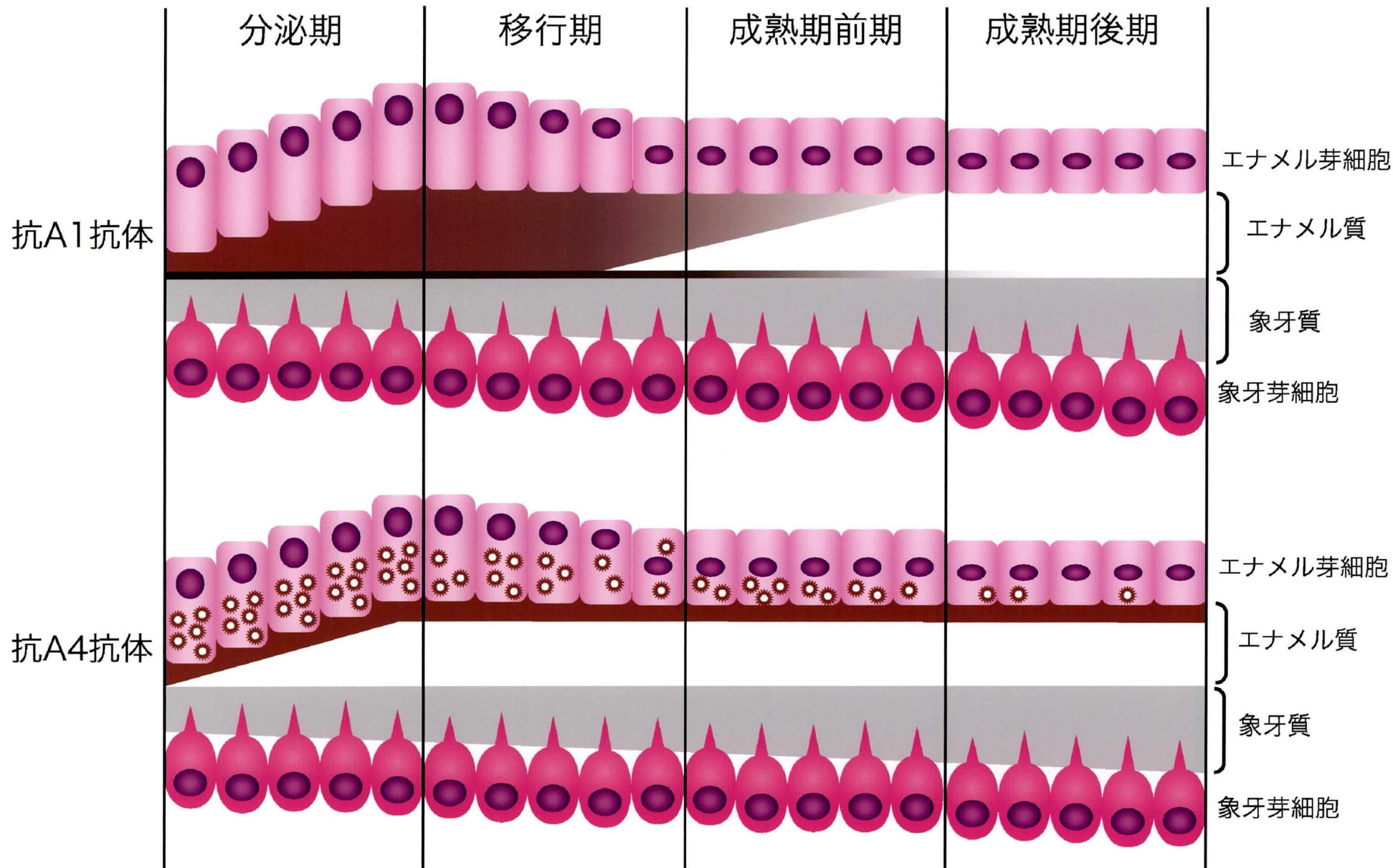


図19 ワニアメロブラスチンタンパクの経時的分布  : 免疫反応陽性領域

表1 エクソン-イントロン境界部の決定に用いたカスタムプライマー

プライマー名	シーケンス	方向	位置 エクソン, コドン
AMBC14	5'-ATTCACAAATGATTGCCATACAAAAC-3'	S	E1, 5'UTR
AMBC15	5'-CATAACGTCAGCATCCAGACATTCAT-3'	A	E2, 1-9
AMBC16	5'-ATGAATGTCTGGATGCTGACGTTATG-3'	S	E2, 1-9
AMBC17	5'TAGCCATTCCACGTGTCCCAGTAT-3'	A	E3, 23-31
AMBC10	5'-GGACACGTGGAATGGCTAGTATGA-3'	S	E3, 25-33
AMBC4	5'-TGTGGAAGCATGTTTCATGTTTTGT-3'	A	E4, 41-49
AMBC1	5'-ACAAAACATGAACATGCTTCCACA-3'	S	E4, 41-49
AMBC3	5'-TGTAACCATGGAAATGAAGAGTGTG3'	A	E5, 70-78
AMBC2	5'-CACACTCTTCATTTCCATGGTTACA-3'	S	E5, 70-78
AMBC11	5'-CTTCGTTTCAGCTGTATTTGACCTTG-3'	A	E6, 129-136
AMBC18	5'-GCAAGGTCAAATACAGCTGAACGAA-3'	S	E6, 130-137
AMBC19	5'-ACCTGACCCAAATGCCCTGAATAT-3'	A	E7, 173-181
AMBC12	5'-ATATTCAGGGCATTGGGGTCAGGT-3'	S	E7, 173-181
AMBC13	5'-ATTGGACCTTGGTGGACTAACTGATG-3'	A	E10, 187-195
AMBC20	5'-ATCAGTTAGTCCACCAAGGTCCAAT-3'	S	E10, 187-195
AMBC21	5'-TGGTTTGCTGCATAGGACATGTAAA-3'	A	E11, 208-216
AMBC22	5'-CTGTTTTACATGTCCTATGCAGCAAA-3'	S	E11, 207-215
AMBC23	5'-ATTTCTTCTGAACTCACTATGCCAAGC-3'	A	E12, 222-231
AMBC7	5'-TTGGCATAGTGAGTTCAGAAGAAAT-3'	S	E12, 223-231
AMBC24	5'-CTCTCAAGTGCAGTAGACCAACATGTT-3'	A	E13, 3'UTR

S; センス, A; アンチセンス, E; エクソン, UTR; 非翻訳領域

表2 アメロブラスチンの推定分子量および等電点

	ワニ	ヒト	ブタ	ウシ	ラット	マウス
推定分子量 (kDa)	42.5	45.3	42.0	39.3	42.4	40.8
予測される 等電点	5.39	4.54	4.98	4.93	5.54	5.50
アミノ酸 残基数	407	421	395	366	396	381

ヒトはToyosawaら (2000) , ブタはHuら (1997) , ウシは (GenBank accession no. AF157019) , ラットはKrebsbachら (1996) , マウスはSimmonsら (1998) の結果を引用した。

表3 ワニアメロブラスチンのエクソン-イントロン境界部のDNA塩基配列

エクソン	塩基配列長		DNA塩基配列	
	エクソン(bp)	イントロン(kb)	スプライス供与部位	スプライス受容部位
1	>110	0.7	CTA ATC AAG gtaatgctaa.....tctgttccag	GTA GAG CTC
2	69	2.4	GCT TTG CCA gtaagtcata.....ttgcttgtag	ATG TAC CCT
3	51	1.4	AGC CTT GAG gtatatgttt.....ttgtcaaaag	ATG AGA CAA
4	42	2.2	CTT CCA CAG gtaaataattt.....aatctcttag	TAT GGT CGG
5	117	1.5	ACC CAA CAG gtgagcattt.....cctgtcacag	TAT GAA TAT
6	240	0.4	CAG CTA CAG gtagctattg.....tctaatagcag	TTA CCA GCG
7	39	0.5	GGT CAG GTG gtaagtcag.....ttcgggtgaag	ATG TAC CCA
8	63	0.1	CAA CCA GCA gtaagtacct.....tgatgtctag	TTG CAT CCT
9	45	0.3	AAC CAA GGA gtaagtctat.....ttttcttttag	GGT GCT CCC
10	45	1.2	GAA ATG CTG gtacgtgact.....ttccccccag	GGA GGC AGA
11	>1019			