

Title	Identification, Characterization, and Expression of Dentin Matrix Protein 1 Gene in <i>Xenopus laevis</i>
Author(s)	米倉, 智子
Journal	歯科学報, 114(4): 398-399
URL	http://hdl.handle.net/10130/3378
Right	

氏名(本籍)	よね くら とも こ 米 倉 智 子 (長野県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第2006号(甲第1247号)
学位授与の日付	平成25年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Identification, Characterization, and Expression of Dentin Matrix Protein 1 Gene in <i>Xenopus laevis</i> DOI : 10.1002/jez.b.22529
掲載雑誌名	Journal of Experimental Zoology. Part B 第320巻 8号 525-537頁 2013年12月
論文審査委員	(主査) 山本 仁教授 (副査) 柴原 孝彦教授 新谷 誠康教授 橋本 貞充准教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

Dentin Matrix Protein 1 (DMP 1)は主に骨細胞や象牙芽細胞で産生され硬組織の石灰化に関与する細胞外基質タンパク質である。生化学的に強酸性を示し、高度なリン酸化による負の荷電のため、 Ca^{2+} と高い結合能を有する。近年、DMP 1機能不全により、常染色体劣性低リン血症性くる病が発症することが明らかになり、DMP 1は生体のリン代謝にも大きく関与していることが示唆されている。このように生体で重要な機能を有すると考えられるDMP 1であるが、一方で進化速度が速い(アミノ酸配列が変化しやすい)という、分子進化学的に矛盾した分子である。本研究では両生類のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*; *X. laevis*)におけるDMP 1のクローニングと遺伝子の構造解析および発現解析を行い、羊膜類のそれと比較することによって分子進化学的にDMP 1の特徴の解明を試みた。

2. 研究方法

*X. laevis*の顎骨よりトータルRNAを抽出し、cDNAを合成後、既知の動物のDMP 1塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行い、その産物をシークエンスすることによって、*X. laevis* DMP 1のcDNA塩基配列を得た。また、別にクローニングしたゲノム塩基配列とcDNA塩基配列を比較することにより、DMP 1遺伝子の構造を明らかにした。次に心臓、肺、胃、肝臓、腎臓、小腸、顎骨、脛骨、骨端骨、筋肉の各組織よりトータルRNAを抽出し、DMP 1の臓器別発現をリアルタイムPCR(RT-PCR)により検討した。さらに、脛骨、顎骨については*in situ* hybridizationを行って、DMP 1 mRNAの発現を観察した。

3. 研究成績および結論

得られた塩基配列より推定されたDMP 1のアミノ酸配列は哺乳類や爬虫類と比較して相同性は低いものの、推定されるタンパク質等電点、アミノ酸構成比率や性質は既知のDMP 1と酷似していた。相同性の低さはDMP 1が進化速度の非常に速い分子であることを再認識させるものであった。一方で、このタンパク質の重要なクリベージサイト周辺やC末端の部位は保存されていた。RT-PCRでは顎骨、脛骨、大腿骨骨頭においてDMP 1が特異的に強く発現していた。*in situ* hybridizationでは、mRNA発現が骨芽細胞には認められず、骨細胞のみに認められた。歯においては象牙芽細胞において発現が認められたが、軟組織には発現してい

なかった。この結果は羊膜類の骨や哺乳類の歯で報告されている DMP 1 の発現様式とはほぼ一致していた。しかし本研究においては、*X. laevis* の歯胚において DMP 1 の発現は初期から中期の歯胚の象牙芽細胞に多く認められ、後期になると発現が認められなくなることが明らかになった。これは、哺乳類において DMP 1 は象牙質の形成だけでなくその後の象牙質の添加や維持に関与するため歯胚の形成段階に関わらず発現するが *X. laevis* において DMP 1 は象牙質の形成のみに関与しその後の象牙質の添加や維持には関与しないことが示唆された。以上のことから *X. laevis* の DMP 1 は骨や歯の形成及び骨の恒常性の維持に関与しており、各々の発育段階に応じて発現が厳密に調節されその発現様式もほぼ保存されていることが示された。進化速度が早くアミノ酸配列の変化が大きい分子が両生類から哺乳類まで類似した発現形式や機能を担っていると考えられることから、DMP 1 はアミノ酸の配列よりもアミノ酸構成やそれによって生み出される生化学的性質が重要な分子であることが推測される。

論文審査の要旨

本論文は、羊膜類で生体硬組織の石灰化とリン代謝に重要な働きをしている細胞外基質タンパク質の Dentin Matrix Protein 1 (DMP 1) 遺伝子のオルソログを両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; *X. laevis*) に求め、遺伝子の構造解析および発現解析を行い、羊膜類のそれと比較することによって分子進化学的な DMP 1 の特徴、発現部位の解明を試みたものである。その結果、得られた推定アミノ酸配列は哺乳類や爬虫類と比較して相同性は低いものの、アミノ酸構成比率や遺伝子構造、推定される諸性質、骨や象牙質における発現様式が酷似していることから、*X. laevis* の DMP 1 は骨や歯の形成及び骨の恒常性の維持に関与しており、DMP 1 は進化の過程でその役割が大きく変化していないことが示唆され、アミノ酸構成やそれによって生み出される生化学的性質が重要な分子であることが推測された。

本審査委員会では、本論文に対し次のような質疑が行われた。① *X. laevis* と *Xenopus tropicalis* との違い、および *X. laevis* を実験動物として選択した理由は何か ② これまでの報告では DMP 1 の歯牙における発現は一定であるが、何故今回の報告では歯胚初期から後期で違いがあるのか ③ この研究を臨床的にどのようにフィードバックするかなどの質問に対して、① *X. laevis* はこれまで発生やゲノムの研究に最も用いられてきた両生類であるが、偽四倍体であるため、最近ではゲノムの研究には二倍体の *Xenopus tropicalis* が用いられることが多いことも事実である。しかし、これまで我々の研究では両生類の representative として一貫して *X. laevis* を用いてきたため今回も使用した。② *X. laevis* の歯は多生歯性であるために形成が完了した後期以降の象牙芽細胞は変性し、その機能はなくなると考えられる ③ このような分子進化学的研究はある分子が何を保存し、何を捨てて進化してきたかを明らかにし、分子の本態を解明するのに役立つため、DMP 1 ではくる病や歯や骨などの硬組織疾患の原因の解明と治療に役立つと考えられる、などの回答が得られた。また、*X. laevis* や爬虫類、鳥類の歯や骨の形成や成長、それらと DMP 1 の関係、実験手技に関する質問、ヒトの遺伝性くる病の病因と病態に対する口頭試問が行われ、概ね妥当な回答が得られた。さらに、緒言や考察の内容、参考文献の記載様式、図表に一部修正箇所の指摘があり、訂正が行われた。

以上の結果、本研究で得られた知見は歯学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。