

## ラット臼歯エナメル質形成における $Ca^{2+}$ 結合性タンパクおよび細胞内 $Ca^{2+}$ シグナル伝達分子の免疫組織化学的局在性

姚 軍<sup>1)</sup> 多賀谷 正 俊<sup>2)</sup> 棚 瀬 精 三<sup>2)</sup> 田 村 康 夫<sup>2)</sup>

### The Immunohistochemical Localization of $Ca^{2+}$ -binding Protein and Intracellular $Ca^{2+}$ -signaling Molecules during Amelogenesis in Rat Molars

YAO JUN, TAGAYA MASATOSHI, TANASE SEIZO and TAMURA YASUO

ラット臼歯のエナメル芽細胞が大量の  $Ca^{2+}$  を司る機構,  $Ca^{2+}$  の動員,  $Ca^{2+}$  のシグナル伝達分子の局在性を明らかにするため,  $Ca^{2+}$  結合タンパクである Calmodulin (CaM), Calbindin (CaB) とチロシンキナーゼ型レセプターである PDGF-R, FGF-R, PLC-, および  $Ca^{2+}$  維持機構に関わる IP3-R と Ca-ATPase の免疫組織化学的局在性をラット臼歯で検討した。

CaB は分化期, 分泌期では強い局在性を示し, 成熟期ではエナメル芽細胞内中央部より遠心側に強い局在性を認めた。CaB は緩衝型タンパクと呼ばれ細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度調節に関わることから, CaB が分化期, 分泌期, 成熟期エナメル芽細胞の  $Ca^{2+}$  濃度調節を担っていることが示唆された。

CaM は分化期, 分泌期では弱く, 成熟期および隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞に強い局在性を示した。Ca-ATPase は CaM とほぼ同様の局在性を示した。CaM は  $Ca^{2+}$  と結合後, 標的蛋白質と結合して生理機能を発揮するとされることから, CaM はエナメル芽細胞の細胞機能に関わることを推察され, Ca-ATPase は CaM 依存性酵素であることから, CaM は成熟期エナメル芽細胞および乳頭層細胞の  $Ca^{2+}$  排出に関わることを示唆された。

PDGF-R, FGF-R, PLC- は, 分化期, 分泌期に強い局在性がみられ, 乳頭層細胞に強い局在性がみられた。IP3-R は分化期, 分泌期, 分泌期後期にもっとも強い局在性を示した。レセプターからの PI レスponse による  $Ca^{2+}$  動員は, 分化期, 分泌期に, 最も活発なことが示唆された。以上のことから, エナメル芽細胞内の  $Ca^{2+}$  動態は細胞の機能発現に関わるシグナルと, 成熟期エナメル芽細胞および中間層細胞, 乳頭層細胞内では機能発現のシグナルと石灰化のための輸送に関与していることが示唆された。

キーワード: カルモデュリン, カルビンディン, ラット臼歯, エナメル形成

*The immunohistochemical localization of calmodulin (CaM) and calbindin (CaB), which are  $Ca^{2+}$ -binding proteins, platelet-derived endothelial growth factor-receptor (PDGF-R), fibroblast growth factor-receptor (FGF-R), and PLC-, which are tyrosine kinase receptors, and IP3-R and Ca-ATPase, which are involved in  $Ca^{2+}$  maintenance, were evaluated in rat molars to clarify the mechanism by which ameloblasts in rat molars control large levels of  $Ca^{2+}$ , the mobilization of  $Ca^{2+}$ , and the localization of  $Ca^{2+}$ -signaling molecules.*

*CaB showed strong localization in differentiation and secretory stages, and stronger localization on the distal side of the ameloblasts in the maturation stage. CaB is referred to as a buffer protein, and is involved in adjusting the  $Ca^{2+}$  concentration; therefore, it was suggested that CaB is related to adjustment of the  $Ca^{2+}$  concentration in the ameloblasts in differentiation, secretory and maturation stages.*

*CaM showed weak localization in differentiation and secretory stages, and strong localization in the maturation*

<sup>1)</sup>福建医科大学附属口腔医科児童牙科  
350002 中国福建省福州市鼓楼区杨桥中路246号

<sup>2)</sup>朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座小児歯科学分野  
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup>Department of Pediatric Dentistry, Fujian University School of Dentistry  
246 Yangqiao Zhong Road, Fuzhou, Fujian, P.R.China

<sup>2)</sup>Department of Pediatric Dentistry, Division of Oral Structure, Function and Development

Asahi University School of Dentistry  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

(平成20年9月1日受理)

stage and on the interlayer and stratum papillary cells. Ca-ATPase revealed a similar localization pattern to that of CaM. CaM binds to  $Ca^{2+}$ , and then to a target protein, and becomes physiologically active; therefore, it was speculated to be involved in the cellular functions of ameloblasts. Ca-ATPase was suggested to be involved in the excretion of  $Ca^{2+}$  by ameloblasts and stratum papillary cells in the maturation period, because it is a CaM-dependent enzyme.

PDGF-R, FGF-R, and PLC- showed strong localization in differentiation and secretory stages and on the stratum papillary cells. IP3-R showed marked localization in differentiation and secretory stages, especially in the late phase of secretion. The mobilization of  $Ca^{2+}$  through the PI response involving the receptors was suggested to be the most active in differentiation and secretory stages. It was suggested that  $Ca^{2+}$  dynamics in ameloblasts are associated with signals involving expressions of cellular function, and  $Ca^{2+}$  dynamics in interlayer and stratum papillary cells are associated with signals involving the expression of function and transportation for calcification.

Key words: Calmodulin, Calbindin, Rat molars, Amelogenesis

## 緒 言

小児歯科領域において、歯の形成の細胞生物学なメカニズムを理解することは、歯の形成障害の診断と治療を考える上においてきわめて重要である。エナメル芽細胞は、増殖を示す内エナメル上皮（未分化期）、分泌前期（分化期）エナメル芽細胞を経て、基質分泌の分泌期エナメル芽細胞へと発育し、さらに石灰化を中心として水分やエナメルタンパクを排除してミネラル成分に置き換える成熟期エナメル芽細胞へと移行する。エナメル質形成にはエナメル芽細胞に隣接する中間層細胞と乳頭層細胞も硬組織形成細胞の1つとして考えられている。エナメル芽細胞の $Ca^{2+}$ の動態については、従来、硬組織形成細胞として、その輸送や石灰化について注目されてきた<sup>1-3)</sup>。しかし、最近では、 $Ca^{2+}$ は神経細胞の興奮、筋肉の収縮の他、増殖、分化、細胞の機能調節に関わる細胞内セカンドメッセンジャーとして重要な役割をもつことが注目されてきている<sup>4-7)</sup>。

細胞には、種々の物質のメッセンジャーがあるが、エナメル質形成において $Ca^{2+}$ はその中で最も重要とされる。普段、細胞質内の $Ca^{2+}$ 濃度は低く保たれているが、Gタンパク共役型レセプターにアゴニストの作用の結果、 $Ca^{2+}$ チャネルが開き細胞外部から $Ca^{2+}$ が流入してセカンドメッセンジャーとして動員される<sup>8)</sup>。ほか、チロシンキナーゼ型レセプター（Fibroblast growth factor-receptor: FGF-R, Platelet-derived endothelial growth factor-receptor: PDGF-R, Epidermal growth factor-receptor: EGF-R）<sup>9,10)</sup>にアゴニストが作用後、イノシトール3リン酸（IP3）を介して細胞内 $Ca^{2+}$ ストア（小胞体、ミトコンドリア、核）から $Ca^{2+}$ が細胞質中に動員される<sup>11)</sup>。そのほか $Ca^{2+}$ の維持機構には、Ca-ATPase（ $Ca^{2+}$ ポンプ）<sup>12)</sup>、 $Na^+$ - $Ca^{2+}$ 交換系があり<sup>13)</sup>、さらに $Ca^{2+}$ 結合性タンパク<sup>14)</sup>が $Ca^{2+}$ 環境の調節や $Ca^{2+}$ との結合により細胞の機能発現を起こすなど多様な働きに関わっ

ている<sup>15)</sup>。従来より、 $Ca^{2+}$ 結合性タンパクに関して Calmodulin, Calbindin, Calretinin の同定、局在性について報告されているが<sup>16)</sup>、エナメル芽細胞のライフサイクルの中での発現と局在性については不明な点が多い。

そこで、本研究は、エナメル芽細胞が大量の $Ca^{2+}$ を司る機構、 $Ca^{2+}$ の動員、 $Ca^{2+}$ のシグナル伝達の局在性を知るため、 $Ca^{2+}$ 結合タンパクである Calmodulin (CaM), Calbindin (CaB) と Ca-ATPase, PDGF-R, FGF-R, PLC-, IP3-R の局在性を免疫組織化学的に検討した。

## 実験材料および方法

実験には Sprague-Dawley (S.D.) 系ラット（中部科学資材社；名古屋）を使用した。実験動物の取り扱いには「朝日大学実験動物取扱指針」に従った。

免疫組織化学的局在性の観察は、5, 7, 10日齢のS.D.系ラットを用いた。上顎第一および第二臼歯を含む頭部矢状断の凍結切片（厚さ約18 $\mu$ m）を凍結切片作製装置（Bright Instrument Company Ltd., Hutingdon, U.K.）により作製した。凍結切片は透明粘着テープに貼付させ、-20℃にて2日間保管し、凍結乾燥後、切片は結露防止のためプラスチック製密閉箱に入れ室温にて戻した。この方法は、Bawden ら<sup>21)</sup>が確立したものである。

CaM, CaB, Ca-ATPase, PDGF-R, FGF-R, PLC- および IP3-R のポリクロナール抗体を用いての免疫組織化学法はABC法により行った。ポリクロナール抗体は、すべてサンタクルーズ社（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.）から購入し使用した。Abitin-Viotin ブロッキングキット（Vector Burlingame, CA U.S.A.）を作用後、4%正常ブタ血清、または4%正常ウサギ血清によりブロッキングを行った。その後、それぞれの一次抗体（Calmodulin, 4 mg/ml; Calbindin, 4  $\mu$ g/ml; Ca-ATPase, 4  $\mu$ g/ml; PDGF-R, 1  $\mu$ g/ml; FGF-R,

2  $\mu$ g/ml; PLC-, 2  $\mu$ g/ml; IP3-R, 4  $\mu$ g/ml) を反応させ、4 日の冷蔵庫内に保管し20時間インキュベートさせた。その後、それぞれの二次抗体(ブタ抗ウサギ IgG, ウサギ抗ヤギ IgG 0.56  $\mu$ g/ml; DAKO Carpinteria, CA, U.S.A.) を60分間反応させ、ABCComplex( DAKO Carpinteria, CA, U.S.A.) を30分間反応させた。その後、0.03% 3,3'-ジアミノベンチジン( DAB )溶液( Sigma St. Louis, MO, U.S.A.; 1 mg DAB/1.5 ml TBS + 1.2  $\mu$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) にて染色を行い観察した。

また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を作用させず、それぞれの血清と二次抗体を反応させた。なお、すべての観察部位は、上顎第一臼歯について行った。

### 結 果

CaM は未分化期では局在性は弱く、分化期、分泌期近心端部にやや強い局在性を認めた。分泌期後期、移行期、成熟期エナメル芽細胞では細胞内中央より遠心側および近心端に強い局在性を示した。また、それらに隣接する中間層細胞および乳頭層細胞にやや強い局在性を示した(図1)。

CaB は未分化期では局在性は弱いだが、分化期、分泌期エナメル芽細胞では近心端部に強い局在性を認めた。分泌期後期および移行期エナメル芽細胞では局在性は弱いだが、成熟期エナメル芽細胞では近心端および細胞内中央より遠心側に最も強い局在性を示した(図2)。

Ca-ATPase は未分化期では局在性は弱く、分化期、分泌期、分泌期後期に強い局在性を示した。移行期、成熟期エナメル芽細胞では近心端および細胞内中央より遠心側にやや強い局在性を示した。また、それらに隣接する中間層細胞および乳頭層細胞に強い局在性を認めた(図3)。

PDGF-R は5日齢では、未分化期にやや強い局在が

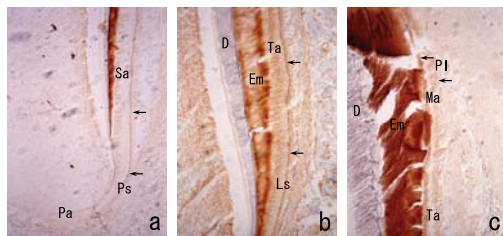


図1. a) CaM は未分化期では局在性は弱く、分化期、分泌期近心端部にやや強い局在性を認める。b, c) 分泌期後期, 移行期, 成熟期エナメル芽細胞では細胞内中央より遠心側および近心端に強い局在性を示す。また、それらに隣接する中間層細胞および乳頭層細胞にやや強い局在性を示す。

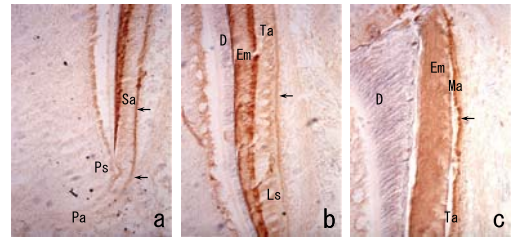


図2. a) CaB は未分化期では局在性は弱いだが、分化期、分泌期エナメル芽細胞では近心端部に強い局在性を認める。b, c) 分泌期後期および移行期エナメル芽細胞では局在性は弱いだが、成熟期エナメル芽細胞では近心端および細胞内中央より遠心側に最も強い局在性を示す。

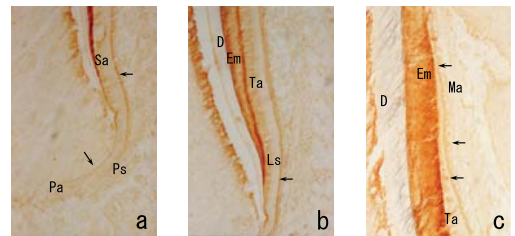


図3. a, b) Ca-ATPase は未分化期では局在性は弱く、分化期, 分泌期, 分泌期後期に強い局在性を示す。b, c) 移行期, 成熟期エナメル芽細胞では近心端および細胞内中央より遠心側にやや強い局在性を示す。また、それらに隣接する中間層細胞および乳頭層細胞に強い局在性を認める。

みられる。分化期から分泌期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞に強い局在性がみられた。分化を開始した象牙芽細胞に強い局在がみられた。7日齢では、分泌期後期エナメル芽細胞、移行期エナメル芽細胞それぞれの近心端およびそれらに隣接する中間層細胞に局在性がみられた。移行期では若干弱い局在性であった。10日齢では、成熟期エナメル芽細胞では局在性は弱く、隣接する乳頭層細胞に若干強い局在性がみられた(図4)。

FGF-R の局在性は5日齢では、PDGF-R と類似しており、未分化期にやや強い局在がみられるが、分化期から分泌期エナメル芽細胞および中間層細胞に強い局在性がみられた。移行期および成熟期エナメル芽細胞では局在性は弱いだが、隣接する中間層細胞および乳頭層細胞に強い局在性が認められた(図5)。

PLC- は未分化期, 分化期, 分泌期エナメル芽細胞近心端部および中間層細胞に強い局在性がみられた。移行期では局在性は弱いだが、成熟期エナメル芽細胞内、近心端、および隣接する中間層細胞、乳頭層細胞に強い局在性がみられた(図6)。

IP3-R は未分化期では局在性は弱いだが、分化期、分泌期、分泌期後期エナメル芽細胞内にもっとも強い局

在性を示した．移行期から成熟期へと弱い局在性を示したが，隣接する中間層細胞，乳頭層細胞に比べ強い局在性が認められた（図7）．

以上の局在性の結果を表1に示す．

### 考 察

Ca<sup>2+</sup>結合性タンパクは，EFハンドドメインという

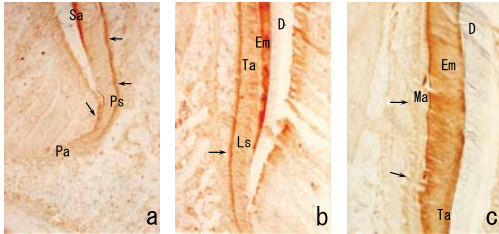


図4． a) PDGF-Rは，未分化期にやや強い局在を示す．分化期から分泌期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞に強い局在性を示す． b) 7日齢では，分泌期後期エナメル芽細胞，移行期エナメル芽細胞それぞれの近心端およびそれらに隣接する中間層細胞に局在性がみられる．移行期では若干弱い局在性を示す． c) 成熟期エナメル芽細胞では局在性は弱く，隣接する乳頭層細胞に若干強い局在性が認められる．

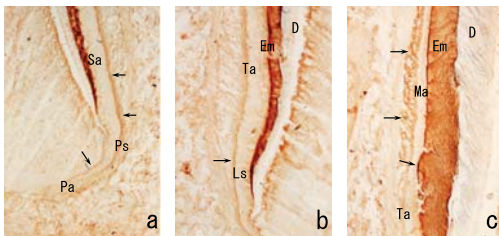


図5． a) FGF-Rの局在性は5日齢では，PDGF-Rと類似しており，未分化期にやや強い局在性を示す，分化期から分泌期エナメル芽細胞および中間層細胞に強い局在性を示す． b, c) 移行期および成熟期エナメル芽細胞では局在性は弱い，隣接する中間層細胞および乳頭層細胞に強い局在性が認められる．

Ca<sup>2+</sup>との結合ループをもつためEFハンドタンパクとも呼ばれる．最近では，このEFハンドタンパクにはCaBなど緩衝型タンパクとしてCa<sup>2+</sup>濃度センサー的に細胞内の濃度調節に関わるもの<sup>18)</sup>と，CaMを代表とするトリガー型タンパクとして，Ca<sup>2+</sup>と結合後，標的タンパクおよび酵素の活性化し細胞応答を引き起こす引き金のタンパク<sup>19)</sup>とに大別される．Hubbard<sup>20)</sup>はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により，CaBは分泌期が成熟期エナメル芽細胞に比べて多いことを示した．本研究では，CaBの免疫組織化学的局在性

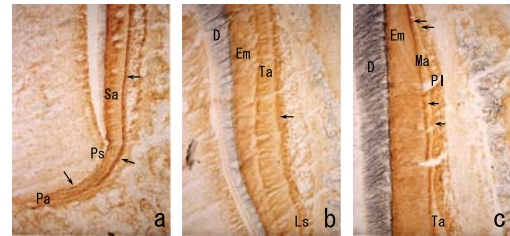


図6． a) PLC-gammaは未分化期，分化期，分泌期エナメル芽細胞近心端部および中間層細胞に強い局在性を示す． b, c) 移行期では局在性は弱い，成熟期エナメル芽細胞内，近心端，および隣接する中間層細胞，乳頭層細胞に強い局在性が認められる．

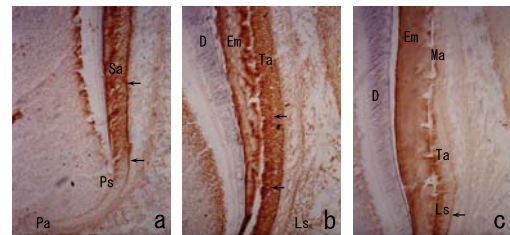


図7． a, b) IP3-Rは未分化期では局在性は弱い，分化期，分泌期，分泌期後期エナメル芽細胞内にもっとも強い局在性を示す． b, c) 移行期から成熟期へと弱い局在性を示すが，隣接する中間層細胞，乳頭層細胞に比べ強い局在性が認められる．

表1． エナメル質形成におけるCaM, CaB, Ca-ATPase, PDGF-R, PLC-g, IP3-Rの免疫組織化学的局在性

	未分化期	分化期	分泌期	移行期	成熟期	乳頭層
CaM	+	+	+	++	++	+++
CaB	+	+++	+++	++	+++	+
Ca-ATPase	±	+++	+++	+	++	+++
PDGF-R	++	++	+++	+	+	++
FGF-R	++	++	++	+	++	+++
PLC-gamma	+++	+++	+++	++	+++	+++
IP3-R	±	++	+++	++	+	±

は、分化期、分泌期エナメル芽細胞の近心端部および隣接する中間層細胞では強い発現を示し、また成熟期エナメル芽細胞では近心端部および細胞内中央より遠心側に同程度の強い発現を示した。免疫反応では定量的な比較はできないが、成熟期においても大量の  $\text{Ca}^{2+}$  を CaB が司ることが示唆された。CaM の局在性は分化期、分泌期に比べて、分泌期後期、移行期、成熟期へと発育が進むにつれて、エナメル芽細胞内および隣接する中間層細胞、乳頭層細胞に発現の増加を示した。Hubbard<sup>20)</sup> は SDS 電気泳動法から CaM は分泌期と成熟期とは同程度であったとしている。この結果も若干の違いがあるものの、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合した CaM が分泌期および成熟期エナメル芽細胞において細胞応答を引き起こすタンパクとして関与することが示唆される。

細胞外および小胞体など  $\text{Ca}^{2+}$  ストアから細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  排出に関わる Ca-ATPase は分泌期、分泌期後期、成熟期エナメル芽細胞の近心端および細胞内中央より遠心側に、さらにそれらに隣接する中間層細胞および乳頭層細胞に局在性が認められた。これらの所見は先人たちの所見<sup>21-23)</sup> と一致するところであり、CaM 依存性酵素である Ca-ATPase<sup>24)</sup> は CaM との共存性が認められたことから、CaM は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合後、分泌期および成熟期エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞および乳頭層細胞において、Ca-ATPase の細胞外へあるいは細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能に関与することが示唆された。

IP3-R は分化期、分泌期エナメル芽細胞内および隣接する中間層細胞にもっとも強い局在性を示した。しかし、成熟期エナメル芽細胞内にも前時期に比べ発現性は弱いものの局在性を示した。PDGF-R および FGF-R も分化期、分泌期エナメル芽細胞の近心端に強い局在性を示し、成熟期初期エナメル芽細胞の弱い局在性を示した所見と一致した。これらのことから、イメージングで認められた分化期、分泌期エナメル芽細胞および隣接する中間層細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  は、チロシンキナーゼ型レセプター結合後の初期反応としてのイノシトールリン脂質の代謝により IP3 が産生される PI レスポンスにより、細胞質内に動員されたシグナルであることが強く示唆される。また成熟期エナメル芽細胞においても PI レスポンスによる  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが分泌期に比べ弱いものの局在することが示唆された。

PDGF-R は分化期、分泌期エナメル芽細胞の近心端部および隣接する中間層細胞に強い局在性を示し、成熟期エナメル芽細胞および隣接する中間層細胞、乳頭層細胞では弱い局在性を示し、IP3-R とほぼ一致した局在性と発現の強さを示した。このことから、PDGF-R は分化期、分泌期エナメル芽細胞に PI レスポンス

を起こして  $\text{Ca}^{2+}$  を動員することが示唆された。一方、FGF-R は PDGF-R と同様に分化期、分泌期エナメル芽細胞に PI レスポンスを起こして  $\text{Ca}^{2+}$  を動員するほか、成熟期エナメル芽細胞に隣接する中間層細胞および乳頭層細胞では PI レスポンスを起こさず、DAG PKC 経路<sup>25)</sup> を有することが推察された。

以上のことから、エナメル芽細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  動態は細胞の機能発現に関わるシグナルと、成熟期エナメル芽細胞および中間層細胞、乳頭層細胞内では機能発現のシグナルと石灰化のための輸送を示していることが示唆された。

## 結 論

エナメル質形成における  $\text{Ca}^{2+}$  機能発現に関わる細胞内シグナル伝達の局在性を免疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

1. レセプターからの PI レスポンスによる  $\text{Ca}^{2+}$  動員は、分化期と分泌期において、最も活発なことが推察された。
2. CaM は、とくに分泌期後期から成熟期エナメル芽細胞および隣接する中間層細胞、乳頭層細胞において、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合して多くの機能発現に関わっていることが示唆された。
3. CaB は分化期、分泌期、成熟期エナメル芽細胞において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に関与することが示唆された。
4. CaM 依存性酵素である Ca-ATPase は、CaM との共存性を認めたことから、分泌期および成熟期エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞および乳頭層細胞において、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合した CaM により細胞外あるいは細胞質内への  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能に関与することが示唆された。
5. エナメル質形成においてエナメル芽細胞内および隣接する中間層細胞、乳頭層細胞に動員される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞の機能発現に関わるシグナルおよび石灰化のための輸送の両者に関与することが示唆された。

## 文 献

- 1) Bawden JW. Calcium transport during mineralization. *Anat Rec.* 1989; 224: 226-233.
- 2) Reith EJ and Boyde A. The pyroantimonate reaction and transcellular transport of calcium in rat molar enamel organs. *Histochemistry.* 1985; 83: 539-543.
- 3) Tanano Y. Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 449-459.
- 4) Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 1995; 80: 259-268.
- 5) 川原茂敬, 井上 剛, 桐野 豊. 神経細胞におけるカルシウムイメージング. 細胞特集. 1998; 30: 15-18.

- 6) 古野忠英, 中西 守. リンパ球におけるカルシウムイオンメーキング. 細胞特集. 1998; 30: 11-14.
- 7) Dailey ME and Smith SJ. Spontaneous  $Ca^{2+}$  transients in developing hippocampal pyramidal cells. *J Neur.* 1994; 25: 243-251.
- 8) Stehno-Bittel L, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Perez-Terzic C and Clapham E. The G protein- subunit transduces the muscarinic receptor signal for  $Ca^{2+}$  release in xenopus oocytes. *J Biol chem.* 1995; 270: 30068-30074.
- 9) 井上博文, 宮園浩平. 細胞増殖因子から見た再生医学. 細胞特集. 2001; 33: 4-7.
- 10) 横手幸太郎. PDGFの生理機能と疾患治療への応用. *Molecular Medicine*. 2001; 38: 250-258.
- 11) Sakai T and Ambudkar IS. Role for protein phosphatase in the regulation of  $Ca^{2+}$  influx in parotid gland acinar cells. *Am J physiol.* 1996; 271: 284-294.
- 12) Jørgensen NR, Geist ST, Civitelli C and Steinberg TH. ATP-and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol.* 1997; 139: 497-506.
- 13) Santana LF, Gomez AM and Lederer WJ.  $Ca^{2+}$  flux through promiscuous cardiac  $Na^+$  channels: slip-mode conductance. *Science* 1998; 279: 1027-1033.
- 14) 祖父江憲治, 初山卓哉, 田岡万悟, 梶 裕之, 磯辺俊明; 御子柴克彦, 遠藤 實, 宮本英七編. カルシウムイオンとシグナル伝達. 蛋白質核酸酵素 (増刊). 東京: 共立出版社; 1998; 43: 1640-1651.
- 15) 田中利男, 加藤晶俊; 小島至編. カルシウムのシグナル伝達機構. 東京: 中外医学社出版; 1993: 61-69.
- 16) Mistry D, Altini M, Coleman HG, Ali H and Maiorano E. The spatial and temporal expression of calcitonin in developing rat molars (*Rattus norvegicus*). *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 973-981.
- 17) Bawden JW, Rozell B, Wurtz T, Fouda N and Hammarström L. Distribution of protein kinase C and accumulation of extracellular  $Ca^{2+}$  during early dentin and enamel formation. *J Dent Res.* 1994; 73: 1492-1436.
- 18) 桑野良三; 御子柴克彦, 遠藤 實, 宮本英七編. カルシウムイオンとシグナル伝達. 蛋白質核酸酵素 (増刊). 東京: 共立出版社. 1998; 43: 1675-1680.
- 19) 田岡万悟, 梶 裕之, 磯辺俊明; EFハンド蛋白質. 御子柴克彦, 遠藤 實, 宮本英七編, カルシウムイオンとシグナル伝達. 蛋白質核酸酵素 (増刊). 東京: 共立出版社. 1998; 43: 1640-1651.
- 20) Hubbard MJ. Calbindin **28KDa** and calmodulin are hyperabundant in rat dental enamel cells identification of the protein phosphatase calcineurin as a principal calmodulin target and of a secretion-related role for calbindin **28KDa**. *Eur J Biochem.* 1995; 230: 68-79.
- 21) Takano Y and Akai M. Demonstration of  $Ca^{2+}$ -ATPase in the maturation ameloblast of rat incisor after vascular perfusion. *J Electron Microsc.* 1987; 36: 196-203.
- 22) Sasaki T and Garant PR. Mitochondrial migration and Ca-ATPase modulation in secretory ameloblasts of fasted and calcium-loaded rats. *Am J Anatomy.* 1987; 179: 116-130.
- 23) Borke J, Zaki AEM, Eisenmann DR and Mednieks MI. Localization of plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump mRNA and protein in human ameloblasts by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 139-144.
- 24) Sasaki T and Garant PR. Calmodulin blocker inhibits  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in secretory ameloblast of rat incisor. *Cell Tissue Res.* 1987; 248: 103-110.
- 25) Sakai T, Okano Y, Nozawa Y and Oka N. Different protein kinase C isozymes could modulate bradykinin-induced extracellular calcium-dependent and -independent increases in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Cell calcium.* 1992; 13: 329-340.