

ラット臼歯エナメル質形成におけるGタンパクの免疫組織化学的局在

堀 竜 平 多賀谷 正 俊 棚 瀬 精 三 田 村 康 夫

The immunohistochemical localization of G protein receptors during the development of rat molars

HORI RYOHEI, TAGAYA MASATOSHI, TANASE SEIZO, TAMURA YASUO

エナメル質形成におけるGタンパクおよびそれに関わるレセプター、細胞内シグナル伝達の局在を明らかにするため、ラット臼歯を用いてGsa, Gia, L型Caイオンチャンネル, Goα, 副甲状腺ホルモンレセプター(PTH-R), Gqα, 血管上皮成長因子(VEGF-R), さらにホスホリパーゼC(PLCβ)の局在性を免疫組織化学的に検討した。

成熟期では、成熟期エナメル芽細胞、中間層細胞さらに乳頭層細胞におけるGsaの発現は、それらの細胞内においてGiaによる抑制を受けずに、細胞機能に関わっていることが推測された。GsaとカップリングするPTH-Rは、分化期から分泌期エナメル芽細胞の近心端部、さらに成熟期エナメル芽細胞の近心端部のみにやや強い発現性を認め、Gsaとの共存性が認められた。PTH-Rのエナメル芽細胞における発現を認めたことは、従来の機能的な実験手法による結果を加味して、GsaとカップリングするPTH-Rは分化期、分泌期、成熟期エナメル芽細胞の機能発現に関わることが推察される。Gsaとの共存性を認めた分化期、分泌期初期のエナメル芽細胞、さらに分泌期後期エナメル芽細胞にはL型Caイオンチャンネルが発現し、細胞内へのCa²⁺導入に関わることが示唆される。Gqαを介するレセプターや細胞膜情報伝達系が分化期、分泌期さらに成熟期のエナメル芽細胞と隣接する中間層細胞、乳頭層細胞において、細胞内のCa²⁺動員を行い、各発育時期での機能発現に関わっていると考えられる。VEGF-Rは、Gqαと同様に内エナメル上皮ではほとんど染色性を認めないが、分化期から分泌期エナメル芽細胞の近遠心端部に強い染色性を認め、Gqαとほぼ同様な染色性を認めた。PLCβは内エナメル上皮、分化期エナメル芽細胞、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すべてに同程度の染色性を認めた。特に分化期および分泌期エナメル芽細胞においてGqαとPLCβと同様の染色性が認められた。

以上より、Gタンパクとそれらに関わるCaイオンチャンネルおよびレセプターはエナメル質形成におけるエナメル芽細胞の各発育時期においてそれぞれの役割や機能に関わることが示唆された。

キーワード：Gタンパク、L型カルシウムイオンチャンネル、副甲状腺ホルモンレセプター、エナメル質形成、ラット臼歯

The purpose of this study was to clarify the localization of the receptor and signal-transduction pathway linkages related to amelogenesis in developing rat molars. Gsa, Gia, L-type calcium channel, Goα, parathormone receptor (PTH-R), Gqα, vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) and phospholipase C (PLCβ) were examined immunohistochemically.

In the maturation stage of ameloblasts, Gsa localization showed that the cells of stratum intermedium and papillary layer were not associated with Gia. PTH-R was stained slightly stronger at only the mesial end of presecretory ameloblasts from the maturation stage to the differentiation stage, and localization was essentially the same with Gsa.

The appearance of PTH-R, with coexistant with Gsa, suggested that the function of the manifestation of ameloblasts in the differentiation stage, secretory stage and also the maturation stage was closely associated with PTH-R.

In the differentiation stage and secretory stage of ameloblasts coupled with Gsa, L-type calcium channels appeared and contributed to the influx of Ca²⁺ inside the cells. A receptor through Gqα and the cell membrane communication

system have been reported to be involved in the function manifestation of ameloblasts by mobilizing intercellular Ca^{2+} at every stage and adjacent to the cells of the stratum intermedium, papillary layer cells.

The VEGF receptor as well as Gq α was not present in the inner dental epithelium, but it showed strong stainability at the mesial and distal ends of ameloblasts in the secretory stage. PLC β appeared in the secretory stage, inner dental epithelium, differentiation stage, the mesial end of ameloblasts and adjacent to the cells of the stratum intermedium. The stainability of Gq α was similar to that of PLC β , in particular in ameloblasts in the differentiation stage and secretory stage.

These results suggest that G proteins, PTH-R and L-type calcium channel associated with the protein, play important roles in each developmental stage of ameloblasts.

Key words: G protein, L-type calcium channel, parathormone receptor, amelogenesis, rat molar,

緒 言

歯の形成における細胞生物学的なメカニズムを知ることは、小児歯科学領域において歯の発育、形成障害を考える上においてきわめて重要である。歯の形成は上皮-間葉の相互作用によりエナメル芽細胞と象牙芽細胞へと組織分化し、基質形成を行い石灰化へと進む。その中でも、特に形成初期の蕾状期、帽状期のシグナル発現、遺伝子発現が注目されてきているが¹⁻⁴⁾、エナメル芽細胞の増殖を示す未分化期、分化を示す分化期から、分泌期、成熟期への一連の発育段階における増殖因子、レセプターとその細胞内シグナル伝達の局在性の報告は少ない⁵⁻⁹⁾。

Gタンパク共役型レセプターは、Gs, Gi, Gq, Goなど数多くのGタンパクとそれぞれにカップリングするレセプターとから成っている。その代表的なものとして、GsはPTH-Rなどにより活性化され¹⁰⁾、Gqは血管上皮成長因子(VEGF)により活性化される¹¹⁾ことが報告されている。三量体Gタンパクは α , β , γ のサブユニットを持ち、レセプターに刺激が加わると、 β と γ のサブユニットが α サブユニットから解離する¹²⁾。Gs α はアデニル酸シクラーゼを活性化し¹³⁾、サイクリックAMP(cAMP)を上昇させる¹⁴⁾。Gi α はGs α からのcAMPを減少させる抑制作用を持つとされる¹⁵⁾。Gs α はL型Caイオンチャンネルを活性化し、細胞内へ Ca^{2+} を流入させる¹⁶⁾。Go α は逆にこのL型Caイオンチャンネルの活性化を抑制する¹⁷⁾。一方、Gq α はその活性化によりPLC β を活性化し¹⁸⁾、細胞内での Ca^{2+} 動員を起こし、PLC β を活性化させる¹⁹⁾ことが報告されている。

歯の形成期におけるGタンパクの一部の局在性については、Bawdenら²⁰⁻²²⁾の未分化期から分泌期までの報告があるが、成熟期エナメル芽細胞へ至るまでのエナメル芽細胞の一連のライフステージにおけるGタンパク局在の変化、さらにそれに関わるイオンチャ

ンネル、レセプターの報告はない。

そこで、本研究では、エナメル質形成における三量体Gタンパクを中心にそれに関わるレセプター、細胞内シグナル伝達の局在性を明らかにするため、ラット臼歯を用いてGs α , Gi α , L型Caイオンチャンネル, Go α , PTH-R, Gq α , VEGF-R, さらにPLC β 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(SD)系ラット(中部科学資材社, 名古屋)より購入し、実験は「朝日大学実験動物取扱指針」に従い行った。

免疫組織化学的試料作製はBawdenらの方法²⁰⁾に従い、5, 10日齢のSD系ラットの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 μ m)を凍結切片作製装置(Bright Instrument Company Ltd., Hutingdon, UK)により作製した。凍結切片は透明粘着テープに貼付させ、 $-20^{\circ}C$ に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て室温に戻し、免疫組織化学染色処理を施した。

一次抗体には、Gs α , Gi α , L型Caイオンチャンネル, Go α , PTH-R, Gq α , VEGF-R, PLC β それぞれの抗ウサギもしくは抗ヤギポリクロナール抗体を用いて、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Santa Cruz社(Santa Cruz, CA, USA)およびSigma社(St. Louis, MO, USA)から購入して使用した。Avidin-Biotinブロッキングキット(Vector Burlingame, CA, USA)を用いてブロッキング後、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4 μ g/ml(抗Gs α 抗体, 抗Gi α 抗体, 抗L型Caイオンチャンネル抗体, 抗Go α 抗体, 抗PTH-R抗体, 抗Gq α 抗体, 抗VEGF-R抗体, および抗PLC β 抗体(2 μ g/ml)を反応させ、 $4^{\circ}C$ で20時間インキュベートした。その後、それぞれの二次抗体0.56 μ g/ml(ブタ抗ウサ

ギ IgG, ウサギ抗ヤギ IgG ; DAKO, CA, USA) を60分間反応させ, Avidin-Biotin Complex (DAKO, CA, USA) 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, USA ; 1 mg DAB/1.5ml TBS+1.2 μ l H₂O₂) 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は, 一次抗体を除き, それぞれの血清と二次抗体を反応させた. すべての観察部位は, 上顎第一臼歯について行った.

結 果

G α は内エナメル上皮における歯乳頭と接する遠心端部と分化期の遠心端部に弱い染色性を示すが, 分化期から分泌期にかけて, 近心端部, 遠心端部ともに染色性の増加が認められた(図 1 a). 成熟期エナメル芽細胞は分泌期後期に比べて強い染色性を示し, 近心端部と細胞内の遠心端側約 1/2, さらに隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞にも最も強い染色性を示した(図 1 b, c).

G β は内エナメル上皮では染色性はほとんどみられず, 分化期から分泌期にいたるにつれて近心端部にやや強い染色性を認めた(図 2 a). 10日齢では, G β は分泌期後期エナメル芽細胞, 移行期の近心端にやや強い染色性を示すが, 成熟期エナメル芽細胞に入ると, G α の染色性とはまったく逆に急激な染色性の低下を認めた(図 2 b, c).

L 型 Ca イオンチャンネルは, 内エナメル上皮の歯乳頭に隣接する遠心端部にやや強い染色性を示し, さ

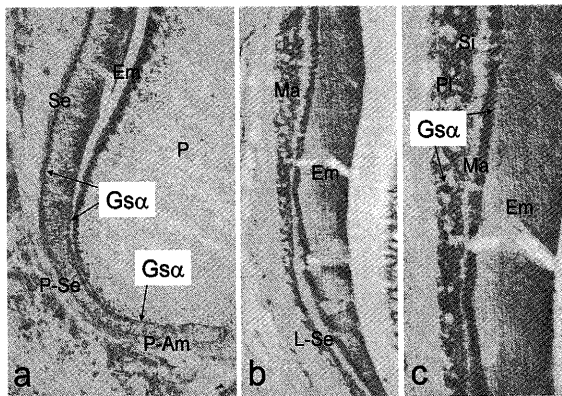


図 1. G α 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) G α は内エナメル上皮 (P-Am) の歯乳頭 (P) と接する遠心端では弱い染色性を示すが, 分化期 (P-Se) から分泌期エナメル芽細胞 (Se) にかけて近遠心端部ともに染色性の増加を認める. b, c) 成熟期エナメル芽細胞 (Ma) は細胞内遠心側約 1/2 と近心端部に強い染色性を示し, 隣接する中間層細胞 (Si), 乳頭層細胞 (Pl) にも強い染色性を示す (c は b の拡大像). Em; エナメル気質, L-Se; 分泌期後期エナメル芽細胞, P; 歯乳頭

らに, 象牙質基質分泌が始まる部位に相当する分化期から分泌期初期のエナメル芽細胞遠心端部と近心端部に強い染色性を示すが, その後は染色性の低下が認められた (図 3 a). 10日齢では, 分泌期後期エナメル芽細胞の遠心端部にやや強い染色性を示すが, 成熟期エナメル芽細胞および隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞ではほとんど染色性が認められない (図 3 b).

G α は内エナメル上皮では弱い染色性を示すが, 分化期から分泌期エナメル芽細胞へと発育が進むにつ

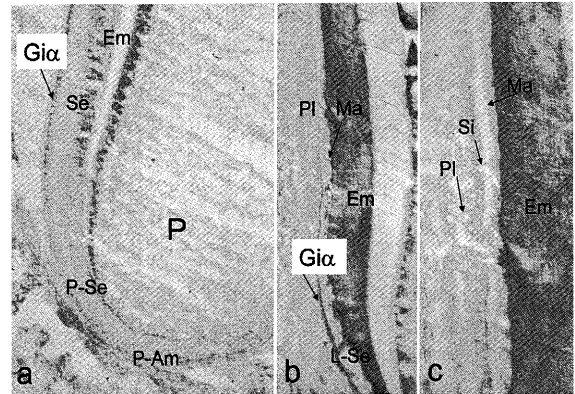


図 2. G β 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) G β は内エナメル上皮 (P-Am) の染色性はほとんどみられず, 分化期 (P-Se) から分泌期 (Se) にいたるにつれてやや強い染色性を認める. b, c) 分泌期後期エナメル芽細胞 (L-Se), 移行期の近心端にやや強い染色性を示すが, 成熟期エナメル芽細胞 (Ma) に入ると, 急激な染色性の低下を認める (c は b の拡大像).

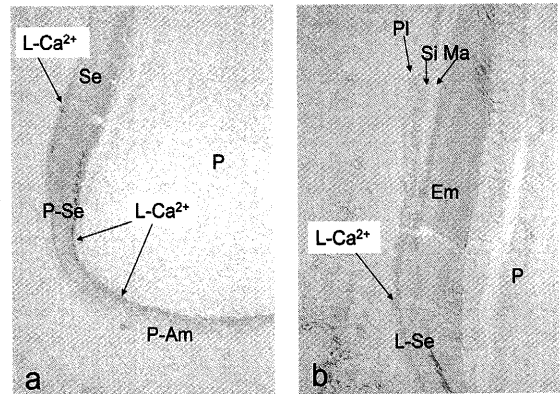


図 3. L 型 Ca イオンチャンネル (L-Ca²⁺) 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) L 型 Ca イオンチャンネル (L-Ca²⁺) は, 内エナメル上皮 (P-Am) の歯乳頭 (P) に隣接する遠心端部にやや強い染色性を示し, さらに, 象牙質基質分泌が始まる部位に相当する分化期 (P-Se) から分泌期初期のエナメル芽細胞遠心端部と近心端部に強い染色性を示すが, その後は染色性の低下がみられる. b) 分泌期後期エナメル芽細胞 (L-Se) の遠心端部にやや強い染色性を示すが, 成熟期エナメル芽細胞 (Ma) および隣接する中間層細胞 (Si), 乳頭層細胞 (Pl) では弱い染色性を示す.

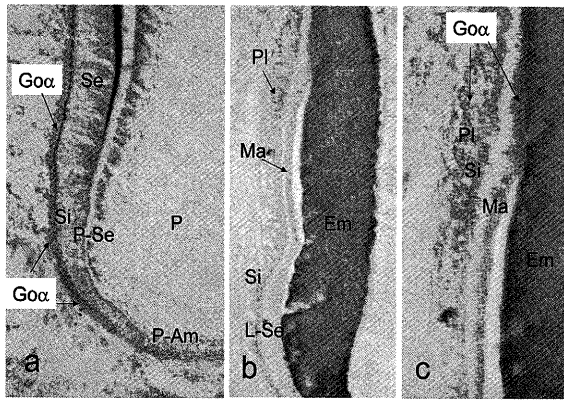


図4. Go α 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) Go α は内エナメル上皮(P-Am)では弱い染色性を示すが、分化期(P-Se)から分泌期エナメル芽細胞(Se)へと発育が進むにつれて、近心端部と隣接する中間層細胞(Si)に染色性の増加が認められる。b, c) 10日齢では、分泌期後期(L-Se)近心端および隣接する中間層細胞(Si)に弱い染色性を認めるが、成熟期(Ma)初期に入るとさらに染色性の減少を認める。しかしその後、成熟期エナメル芽細胞(Ma)は発育が進むにつれて近心端部と細胞内遠心側約1/2部、隣接する中間層細胞(Si)、さらに乳頭層細胞(Pl)に徐々に染色性の増加が認められる(cはbの拡大像)。

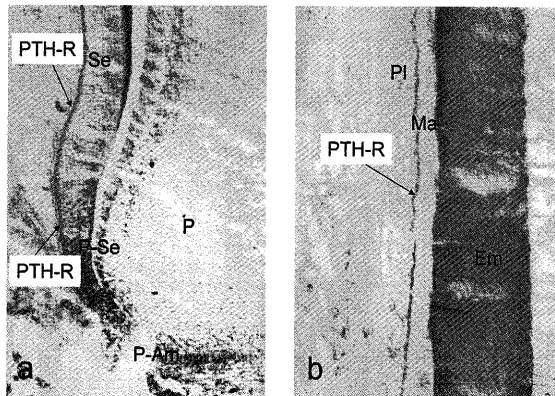


図5. 副甲状腺ホルモンレセプター(PTH-R)抗体の免疫組織化学的染色像.

a) PTH-Rは、内エナメル上皮(P-Am)ではほとんど染色性がみられないが、分化期(P-Se)から分泌期(Se)にかけて近心端部に強い染色性を認める。b) 10日齢では、成熟期エナメル芽細胞(Ma)の近心端のみにやや強い染色性を認める。

れて、近心端部と隣接する中間層細胞に染色性の増加が認められた(図4 a)。10日齢では、分泌期後期近心端および隣接する中間層細胞に弱い染色性を認めるが、成熟期初期に入ると染色性の低下を認めた。しかしその後、成熟期エナメル芽細胞の発育が進むにつれて近心端部および細胞内遠心側約1/2部、隣接する中間層細胞、さらに乳頭層細胞に徐々に染色性の増加を認めた(図4 b, c)。

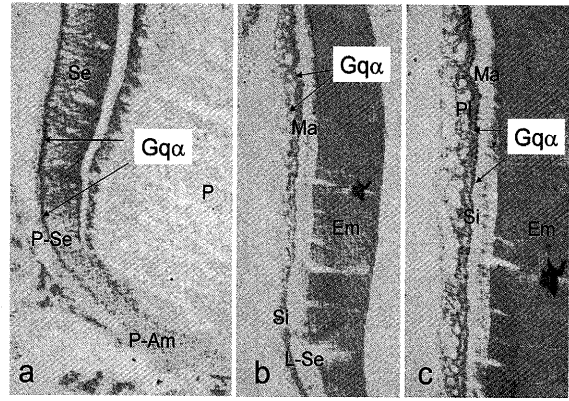


図6. Gq α 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) Gq α は内エナメル上皮(P-Am)では染色性を認めないが、分化期(P-Se)から分泌期エナメル芽細胞(Se)の近遠心端部ともに強い染色性を認める。b, c) 10日齢では分泌期後期エナメル芽細胞(L-Se)の近心端および隣接する中間層細胞(Si)にやや強い染色性を認めるが、成熟期エナメル芽細胞(Ma)の近心端と隣接する中間層細胞(Si)および乳頭層細胞(Pl)では咬頭方向に向かい染色性の上昇を認める(cはbの拡大像)。

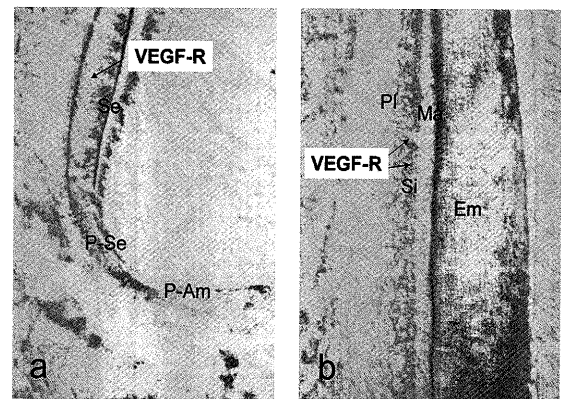


図7. VEGFレセプター抗体の免疫組織化学的染色像.

a) VEGFレセプターは内エナメル上皮(P-Am)ではやや弱い染色性を示すが、分化期(P-Se)から分泌期エナメル芽細胞(Se)の近心端に強い染色性を認める。b) 10日齢においては、成熟期エナメル芽細胞(Ma)の近心端および隣接する中間層細胞(Si)、乳頭層細胞(Pl)にやや強い染色性を認める。

PTH-Rは、内エナメル上皮ではほとんど染色性がみられないが、分化期から分泌期エナメル芽細胞の近心端部において強い染色性を認めた(図5 a, b)。10日齢では、分泌期後期の染色性は弱いですが、成熟期に入ると成熟期エナメル芽細胞の近心端部のみにやや強い染色性を認めた(図5 b)。

Gq α は内エナメル上皮では染色性が認められないが、分化期から分泌期エナメル芽細胞にかけて近遠心端部ともに強い染色性を認めた(図6 a)。10日齢では分泌期後期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中

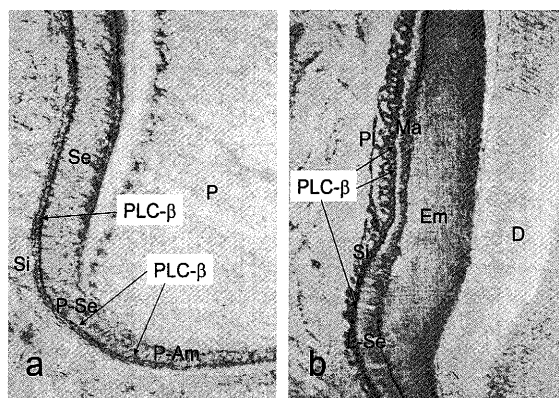


図8. PLC β 抗体の免疫組織化学的染色像.

a) PLC β は内エナメル上皮(P-Am), 分化期(P-Se), 分泌期エナメル芽細胞(Se)の近心端部および隣接する中間層細胞(Si)すべてに同程度の染色性を認める. b) 10日齢では分泌期後期エナメル芽細胞(L-Se)の近心端および隣接する中間層細胞(Si)に強い染色性を認め, 成熟期エナメル芽細胞(Ma)の近心端, 細胞内部および隣接する中間層細胞(Si), 乳頭層細胞(Pl)に強い染色性を認める.

間層細胞にやや強い染色性を認めるが, 成熟期では成熟期エナメル芽細胞の近心端と隣接する中間層細胞に強い染色性を認め, エナメル芽細胞の近心端と乳頭層細胞は咬頭方向に向かい染色性の上昇を認めた(図6 b, c).

VEGF-Rは, Gq α と同様に内エナメル上皮ではほとんど染色性を認めないが, 分化期から分泌期エナメル芽細胞の近遠心端部に強い染色性を認め, Gq α とほぼ同様な染色性を認めた(図7a). 10日齢においても, VEGFレセプターはGq α とほぼ同様に, 成熟期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞に強い染色性を認めた(図7b).

PLC β は内エナメル上皮, 分化期エナメル芽細胞, 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すべてに同程度の染色性を認めた. 特に分化期および分泌期エナメル芽細胞においてGq α とPLC β と同様の染色性が認められた(図8a). 10日齢ではPLC β の局在性はGq α , PLC β とほぼ同様に, 分泌期後期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中間層細胞に強い染色性を認め, 成熟期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞に強い染色性を認めた(図8b).

考 察

アデニル酸シクラーゼを活性化し, cAMPを上昇させるGs α ^{13,14}は, エナメル芽細胞への分化開始期に先だつ上皮細胞の増殖期には発現性が弱く, 分化期から分泌期に強い発現が認められた. 分泌期後期から, さ

らに成熟期へと発育が進むにつれて, エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞にGs α の強い発現性が認められた. Gs α の活性化に対して抑制的に働くと考えられるGi α ¹⁵は内エナメル上皮, 分化期では発現性が弱く, 分泌期エナメル芽細胞の近心端部ではやや強い発現性を認めた. 分泌期後期, 移行期では近心端にやや強い発現性を認めたが, 成熟期に入ると, 成熟期エナメル芽細胞, 隣接する中間層細胞および乳頭層細胞のGi α の発現性はGs α とはまったく異なり, 急激な発現性の消失を認めた. これらの所見から, とくに成熟期では, 成熟期エナメル芽細胞, 中間層細胞さらに乳頭層細胞におけるGs α の発現は, それらの細胞内においてGi α による抑制を受けずに, 細胞機能に関わっていることが推測された.

Gs α とカップリングするPTH-R¹⁴は, 分化期から分泌期エナメル芽細胞の近心端部, さらに成熟期エナメル芽細胞の近心端部のみやや強い発現性を認め, Gs α との共在性が認められた. 象牙芽細胞においてPTH-Rの局在を認めた報告²³はあるが, エナメル芽細胞における発現については現在まで報告がない. しかし, PTHとエナメル質形成に関して, ラットにPTHを注入した場合, 発育中のエナメル質へのCa²⁺取込量の増加がみられたという報告²⁴がある. また, 逆にPTHを欠如させたラットの切歯エナメル質に石灰化障害がみられたという報告²⁵があり, エナメル質形成においてPTHは重要な役割を持つことが示唆されている. 本研究においてPTH-Rのエナメル芽細胞における発現を認めたことは, 従来の機能的な実験手法による結果を加味して, Gs α とカップリングするPTH-Rは分化期, 分泌期, 成熟期エナメル芽細胞の機能発現に関わることが推察される.

膜電位依存性のCaイオンチャンネルには, 性質の異なるいくつかのサブタイプがある. T型とL型Caイオンチャンネルは多種多様な細胞で発現している^{26,27}が, N型とP型は神経細胞のみに見出されている^{28,29}. L型Caイオンチャンネルは象牙芽細胞において発現を認めた報告³⁰はあるが, エナメル芽細胞での発現の報告はない. 本研究において, L型Caイオンチャンネルは内エナメル上皮の歯乳頭に隣接する遠心端部にやや強い発現性を認め, さらに, 象牙質基質分泌が始まる部位に相当する分化期から分泌期初期のエナメル芽細胞遠心端部と近心端部に強い発現性を認めた. しかし, それ以降の分泌期には発現性の減少が認められた. 分泌期後期エナメル芽細胞の遠心端部にやや強い染色性を示すが, 成熟期ではエナメル芽細胞, 隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞にはほとんど染色性が認められなかった. L型CaイオンチャンネルはGs

α の活性化で開く¹⁶⁾とされることから $G_s\alpha$ との共存性を認めた分化期, 分泌期初期のエナメル芽細胞, さらに分泌期後期エナメル芽細胞には L 型 Ca イオンチャンネルが発現し, 細胞内への Ca^{2+} 導入に関わることが示唆される. 一方, L 型 Ca イオンチャンネルを閉じるとされる $G_o\alpha$ ¹⁷⁾ は, 分化期, 分泌期エナメル芽細胞の近心端部と隣接する中間層細胞に発現性を認めたが, 象牙前質, 象牙質に隣接する分化期, 分泌期初期のエナメル芽細胞遠心端側には強い発現を認めないことから, 分化期, 分泌期初期のエナメル芽細胞の遠心側に発現した Ca イオンチャンネルは $G_o\alpha$ によって閉鎖されることなく細胞内への Ca^{2+} 導入が起こる可能性を推察させる所見である. 象牙前質が現れることにより分化期エナメル芽細胞はエナメル基質の合成を始め, 分泌期エナメル芽細胞へと変化する. この象牙前質にはフリーな Ca^{2+} が多く局在することが認められ²⁰⁾, またその部位には Ca^{2+} 感知性レセプターが発現する²²⁾とされており, 分化期, 分泌期初期のエナメル芽細胞が象牙前質から上昇した Ca^{2+} を感知するとともに細胞内への Ca^{2+} 導入を行うことが考えられる. 一方, 成熟期エナメル芽細胞およびそれに隣接する中間層細胞や乳頭層細胞において L 型 Ca イオンチャンネルの発現性が弱いことから, 大量の Ca^{2+} を必要とする成熟期では, 細胞外からの Ca^{2+} の取り込みに L 型 Ca イオンチャンネルは関わりが少ないことが考えられる.

$G_o\alpha$ は成熟期初期に, 急激な発現性の減少が認められた. この時期はエナメル芽細胞にアポトーシスが最も多く見られる時期である^{31,32)}. $G_o\alpha$ は Bcl-2 や Ras を活性化する³³⁾とされる. アポトーシスに対して抑制的に働く Bcl-2³⁴⁾ は成熟期初期において発現性が弱く, ダウンレギュレーションがみられたことを Kondo ら³⁵⁾ が報告している. $G_o\alpha$ はこの時期には, アポトーシスと関わりダウンレギュレーションを示していることが示唆された.

$G_q\alpha$, $G_q\alpha$ とカップリングする VEGF レセプター¹¹⁾, さらに細胞内シグナルである $PLC\beta$ ¹⁸⁾ はともに, 分化期エナメル芽細胞と分泌期エナメル芽細胞それぞれの近心端部と遠心端部に強い発現性を認めた. さらに, 成熟期エナメル芽細胞の近心端と隣接する中間層細胞と乳頭層細胞に強い発現性を認めた. $PLC\beta$ は EGF レセプター, FGF レセプターなどのチロシンキナーゼ型レセプターから活性化される $PLC\gamma$ とともにイノシトールリン脂質を分解し, イノシトール 1,4,5-三リン酸を産生し³⁶⁾, 小胞体などのカルシウムストアから細胞内への Ca^{2+} 動員を行い, カルモジュリンなどのタンパクと結合して細胞の機能発現に関わる³⁷⁾

とされている. $G_q\alpha$ を介するレセプターや細胞膜情報伝達系が分化期, 分泌期さらに成熟期のエナメル芽細胞と隣接する中間層細胞, 乳頭層細胞において, 細胞内の Ca^{2+} 動員を行い, 各発育時期での機能発現に関わっていると考えられる.

結 論

ラット臼歯のエナメル質形成における G タンパクとそれらに関わる Ca イオンチャンネル, レセプターの免疫組織化学的局在性を検討した結果, 以下の結論を得た.

- 1) ラット臼歯のエナメル質形成において $G_s\alpha$ とそれに拮抗する $G_i\alpha$ との局在性の相違が明らかとなった.
- 2) L 型 Ca イオンチャンネルとそれに関わる G タンパクとの局在が明らかにできた. また, Ca^{2+} を細胞外のエナメル基質へ輸送する成熟期では L 型 Ca イオンチャンネルの発現は減少し, その時期の細胞内の Ca^{2+} 動員には関わりが少ないことが示唆された.
- 3) PTH-R は分化期, 分泌期, 成熟期エナメル芽細胞に強い発現を認め, $G_s\alpha$ との共存性を認めた.
- 4) $G_q\alpha$, およびそれとカップリングする VEGF-R, さらに $PLC\beta$ はそれぞれ共存性を認めた.

以上の結果から, G タンパクとそれらに関わる Ca イオンチャンネル, レセプターはエナメル質形成におけるエナメル芽細胞の各発育時期それぞれの役割や機能に関与していることが示唆された.

文 献

- 1) Mitsiadis TA, Muramatsu T, Muramatsu H and Thesleff I. Midkine (MK), a heparin-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis. *J Cell Biol.* 1995; 129: 267-281.
- 2) Thesleff I, Partanen AM, Vainio S. Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the role of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. *J Craniofacial Genet Dev Biol.* 1991; 11: 229-237.
- 3) Thesleff I, Vahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res.* 1995; 32: 9-15.
- 4) 里方一郎, 内山 聖. Msx 遺伝子 器官形成における上皮-間葉相互作用の誘導. *細胞工学.* 1997; 16: 668-677.
- 5) Tanase S and Bawden JW. The immunohistochemical localization of signal-transduction pathway components Jak

- 1, Jak2, Jak3, Tyk2 and STAT-1 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1996; 41: 925-940.
- 6) Tanase S and Bawden JW. The immunohistochemical localization of STAT-2, -3, -4 and -5 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1996; 41: 1149-1160.
- 7) Otsuji W, Tanase S, Yoshida S and Bawden JW. The immunohistochemical localization of the interferon- γ and granulocyte colony-stimulating factor receptors during early amelogenesis in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1999; 44: 173-181.
- 8) 棚瀬精三, 尾辻 渉, 谷川良謙, 近藤 俊, 安井清子, 原田 洋, 龍崎健栄, 田村康夫: ラット臼歯エナメル器におけるインターロイキン-6およびインターロイキン-10レセプターの免疫組織化学的局在. *小児歯誌.* 1999; 37: 466-474.
- 9) Joseph BK, Gobe CG, Savage NW and Young WG. Expression and localization of sulphated glycoprotein-2 mRNA in the rat incisor tooth ameloblasts: relationships with apoptosis. *Int J Exp Path.* 1994; 75: 313-320.
- 10) Iida-Klein A, Guo J, Xie L, Juppner H, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Bringham FR, Abou-Samra AB and Segre GV. Truncation of the carboxyl-terminal region of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor enhances PTH stimulation of adenylyl cyclase but not phospholipase C. *J Biol Chem.* 1995; 270: 8458-8465.
- 11) Zeng H, Zhao D, Yang S, Datta K and Mukhopadhyay D. Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278: 20738-20745.
- 12) Iyengar R and Birnbaumer L. Roles of G proteins and G protein subunits in signal transduction. *Lymphokine Res.* 1990; 9: 533-537.
- 13) Masters SB, Miller RT, Chi MH, Chang FH, Beiderman B, Lopez NG and Bourne HR. Mutations in the GTP-binding site of Gs alpha alter stimulation of adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1989; 264: 15467-15474.
- 14) Saunier B, Dib K, Delemer B, Jacquemin C and Correze C. Cyclic AMP regulation of Gs protein. Thyrotropin and forskolin increase the quantity of stimulatory guanine nucleotide-binding proteins in cultured thyroid follicles. *J Biol Chem.* 1990; 265: 19942-19946.
- 15) Toro MJ, Montoya E and Birnbaumer L. Inhibitory regulation of adenylyl cyclases. Evidence inconsistent with beta gamma-complexes of Gi proteins mediating hormonal effects by interfering with activation of Gs. *Mol Endocrinol.* 1987; 1: 669-676.
- 16) Mattera R, Graziano MP, Yatani A, Zhou Z, Graf R, Codina J, Birnbaumer L, Gilman AG and Brown AM. Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science.* 1989; 243: 804-807.
- 17) Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W and Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature.* 1987; 325: 445-447.
- 18) Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG and Ross EM. Phospholipase C-beta1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell.* 1992; 70: 411-418.
- 19) Ryu SH, Kim UH, Wahl MI, Brown AB, Carpenter G, Huang KP and Rhee SG. Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1990; 265: 17941-17945.
- 20) Bawden JW, Rozell B, Wurtz T, Fouda N and Hammarstrom L. Distribution of protein kinase C alpha and accumulation of extracellular Ca²⁺ during early dentin and enamel formation. *J Dent Res.* 1994; 73: 1429-1436.
- 21) Bawden JW, Moran RA, Deaton TG and Saour CM. Immunohistochemical localization of signal transduction pathways during amelogenesis: an initial exploration. *Adv Dent Res.* 1996; 10: 105-110.
- 22) Moran RA, Brown EM and Bawden JW. Immunohistochemical localization of G \cdot q, PLC γ , G \cdot i1-2, PKA, and the endothelin B and extracellular Ca²⁺-sensing receptors during early amelogenesis. *J Dent Res.* 2000; 79: 1896-1901.
- 23) Lundgren T, Stenport V, Wetter A and Linde A. Parathyroid hormone (1-34) receptor-binding and second-messenger response in rat incisor odontoblasts. *Calcif Tissue Int.* 1998; 62: 255-259.
- 24) Bawden JW, Deaton TG and Crenshaw MA. The effects of parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites on calcium transport in the secretory rat enamel organ. *J Dent Res.* 1983; 62: 952-955, 1983.
- 25) Acevedo AC, Chardin H, Staub JF, Septier D and Goldberg M. Morphological study of amelogenesis in the rat lower incisor after thyro-parathyroidectomy, parathyroidectomy and thyroidectomy. *Cell Tissue Res.* 1996; 283: 151-157.
- 26) Kamishima T and Quayle JM. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac and smooth muscle cells. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 943-946.
- 27) Protas L and Robinson RB. Mibefradil, an I(Ca, T) blocker, effectively blocks I(Ca, L) in rabbit sinus node cells. *Eur J Pharmacol.* 2000; 401: 27-30.
- 28) Takahashi K, Wakamori M and Akaike N. Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances. *Neurosci Lett.* 1989; 104: 229-234.
- 29) Llinas R, Sugimori M, Lin JW and Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 1689-1693.

- 30) Seux D, Joffre A, Fosset M and Magloire H. Immunohistochemical localization of L-type calcium channels in the developing first molar of the rat during odontoblast differentiation. *Archs Oral Biol.* 1994; 39: 167-170.
 - 31) Warshawsky H and Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat. Rec.* 1974; 179: 423-446.
 - 32) Bronckers AL, Lyaruu DM, Goei W, Litz M, Luo G, Karsenty G, Woltgens JH and D' Souza RN. Nuclear DNA fragmentation during postnatal tooth development of mouse and hamster and during dentin repair in the rat. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 102-111.
 - 33) Li JL, Zhu JH, Jing ZZ, Chen ZC and Xiao ZQ. G-protein-coupled muscarinic acetylcholine receptor activation up-regulates Bcl-2 and phospho-bad via Ras-ERK-1/2 signaling pathway. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2003; 35: 41-48.
 - 34) Oltvai ZN, Millman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerized in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993; 74: 609-619.
 - 35) Kondo S, Tamura Y, Bawden JW and Tanase S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Archs Oral Biol.* 2001; 46: 557-568.
 - 36) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ and Schulz I. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature.* 1983; 306: 67-69.
 - 37) Zheng Z, Wang ZM and Delbono O. Ca^{2+} calmodulin kinase and calcineurin mediate IGF-1-induced skeletal muscle dihydropyridine receptor α 1S transcription. *J Membr Biol.* 2004; 197: 101-112.
-