

# エナメル芽細胞の annular gap junction の分布と ギャップ結合タンパク質 Cx43 の変動

Distribution of annular gap junctions and stage-specific changes of gap  
junction protein Cx43 in rat incisor ameloblasts

西川 純雄

Sumio Nishikawa

## 要 旨

ラット切歯エナメル芽細胞のギャップ結合の細胞内への取り込みを示す annular gap junction の分布を内エナメル上皮細胞からエナメル質内層と外層を形成している基質形成期エナメル芽細胞、さらには成熟期エナメル芽細胞に接する乳頭層細胞で透過型電子顕微鏡により調べた。また、ギャップ結合タンパク質の Cx43 を蛍光免疫組織化学により観察した。この結果、分化期から成熟期に至るまで多くの annular gap junction が観察された。その一部はオートファジーにより処理されていた。遠位部細胞間結合装置の Cx43 は内層と外層を形成するエナメル芽細胞で細胞間に見られ、それぞれの段階に必要なギャップ結合がこの場所で作られていることになる。一方内層形成から外層形成へ移行する少し前の段階で大きな斑点状の Cx43 の蛍光が見られ、これは多くの annular gap junction がこの場所で作られていると考えられた。結論として、エナメル質形成のそれぞれの段階で大規模なギャップ結合の改変が起きていることが示唆された。

## はじめに

ギャップ結合は細胞間結合装置の一つである。その働きは細胞間のコミュニケーションに関わり、分子量 1,000 以下の分子の細胞間の交通を可能にしている (Alberts et al., 2015)。ギャップ結合はコネクシンタンパク質が 6 個集まりコネクソンまたはヘミチャネルを形成する。隣接する細胞同士でコネクソンが対合し、ギャップ結合が形成される (Alberts et al., 2015)。コネクシン 43 (Cx43) はよく知られたコネクシンでエナメル芽細胞でもその存在が知られている (Kagayama et al., 1995; Inai et al., 1997)。心筋の介在板ではここを介してイオンを移動させ、心筋収縮の同調性を確保していると考えられる。

エナメル芽細胞には豊富なギャップ結合が見られ、電子顕微鏡による多くの研究が報告されている (Sasaki et al., 1981)。とりわけフリーズフラクチャー法により示されてきた (Warshawsky, 1978; Sasaki et al., 1981)。さらにギャップ結合タンパク質 Cx32 が、Cx43 に加えて、エナメル芽細胞に見られることも報告されている (Fried et al., 1996)。Cx43 抗体を用いた免疫組織化学はこのコネクシンが分化期の内エナメル上皮細胞や基質形成期エナメル芽細胞に特有の分布を

とることを明らかにしてきた (Inai et al., 1997)。したがってエナメル芽細胞同士やエナメル芽細胞と他のエナメル器の細胞との間で、密接なコミュニケーションがあることになる。

Annular gap junction はギャップ結合の分解過程でしばしば観察されている構造である。ギャップ結合が丸ごと一つの細胞の側に取り込まれ、ギャップ結合を含んだ小胞を形成する。これを annular gap junction (AGJ) という。成熟期のエナメル芽細胞に接した乳頭層細胞にも多くの AGJ が見られることが報告されている (Sasaki and Garant, 1986)。これらは autophagy または endo/lysosomal degradation により処理される (Thévenin et al., 2013; Fong et al., 2012; Laird 2010)。エナメル芽細胞には非常に多数の annular gap junction が見られる。本研究ではエナメル芽細胞の細胞間結合装置複合体、特に遠位部細胞間結合装置のレベルでのギャップ結合の消長を Cx43 免疫組織化学と透過型電子顕微鏡を用いて観察した。免疫組織化学の結果、分化期から基質形成期への移行部、内層エナメル質形成期から外層エナメル質形成期への移行部で Cx43 の分布に変動が見られた。電子顕微鏡観察からは分化期から成熟期を通して多数の annular gap junction が認められた。この処理の一つとして、オートファジー像も認められた。こ

これらの結果は、エナメル質形成の段階に応じた特有なギャップ結合分布がエナメル芽細胞機能に必須であることを示している。これはエナメル芽細胞が集団で移動することと関わりあるかもしれない。またエナメル芽細胞集団が均一なエナメル基質を形成することと関わりがあるかもしれない。

## 材料と方法

4週齢雄ラット (Jcl Wistar, 日本クレア、東京) を用いた。動物は麻酔下に屠殺し、上顎と下顎を採取し、4%パラホルムアルデヒド溶液で一晩固定した。5% EDTA、pH 7.2 で3週間脱灰し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。細切した上下顎は25%スクロース液に浸漬し、急速凍結し、凍結マイクロトーム (HM505E, Microm, Walldorf, Germany) で凍結切片を作製した。切片はウサギポリクローナル抗コネキシン 43 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO) を1%牛血清アルブミン、PBS で10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈して使用した。二次抗体としては Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 555 を付けた抗ウサギ IgG (Invitrogen, Camarillo, CA) を用いた。一部の切片は二次抗体に Alexa Fluor 647 phalloidin (50 倍希釈、F-actin の標識) と Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DNA の標識) を加えた。

電子顕微鏡用には Wistar 雄ラット 2 匹 (Jcl Wistar, 体重 210g と 220g、日本クレア、東京) を用いた。0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で5%に希釈したグルタルアルデヒド液で15分間灌流固定し、のち同じ固定液に浸漬して2時間固定した。5% EDTA で脱灰した。細切した後、2%四酸化オスミウムで2時間固定した。エタノールで脱水し Epon812 で包埋した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、Jeol1200EXII (Jeol, Tokyo, Japan) で観察した。

## 結果

エナメル質形成は増殖期内エナメル上皮、分化期内エナメル上皮、基質形成期エナメル芽細胞、成熟期エナメル芽細胞、退縮エナメル上皮と一連の変化の過程で、エナメル芽細胞によって行われる。本研究では基質形成期エナメル芽細胞を中心に、一部は分化期内エナメル上皮細胞と成熟期エナメル芽細胞についてギャップ結合タンパク質の Cx43 の局在を蛍光抗体法により調べた。また、エナメル芽細胞には多数の annular gap junction (AGJ) が知られているのでこれを調べた。

透過型電子顕微鏡で観察すると、分化期内エナメル上皮細胞の遠位部、すなわち象牙芽細胞に近い側にギャップ結合が見られ、また AGJ も多数みられた (図 1a)。拡大すると円形のものが多く直径が 500 nm 程度

のものが多かった (図 2a)。一部のものは内側に凹んでいて内容物の電子密度の高いものも見られた (図 2b)。これは AGJ の内容物がサイトゾル中に流失し体積の減少が生じていることを想像させる。基質形成期は二つの段階に分けられる。1つはエナメル質内層を形成する時期で、もう1つは外層を形成する時期である。前者を形成するエナメル芽細胞の遠位部細胞間結合装置とアクチン線維は異方性を示し、向きによってその発達が異なる。一方後者を形成するエナメル芽細胞の遠位部細胞間結合装置とアクチン線維は等方性を示し、均一な発達が見られる。前者ではエナメル芽細胞の側方移動が起こるし、後者では起らない。細胞間結合装置と細胞骨格はこの側方移動に関わると考えられる。内層を形成しているエナメル芽細胞ではトームス突起基部に多くのギャップ結合がみられた (図 1b)。トームス突起から少し離れたところの横断面にも AGJ が見られた (図 2c)。遠位部細胞間結合装置を形成するギャップ結合から AGJ が形成されるところを観察することができた (図 1b)。また、完成した AGJ はエナメル質外層を形成するエナメル芽細胞の遠位部細胞間結合装置付近や成熟期乳頭層細胞にも観察された (図 2d, e)。したがって、分化期、エナメル質内層形成期、エナメル質外層形成期、さらに成熟期のいずれの時期でも多くの AGJ が見られたことになる。

AGJ がギャップ結合の改変と破壊に関わる構造であることを考えると、分化期からエナメル質形成期へ変化する時期、およびエナメル質内層形成期から外層形成期へ変化する時期にギャップ結合による細胞間コミュニケーションの変動が見られることを示唆している。また、AGJ を処理するオートファゴソームと思われる像 (図 2f) も観察され、エナメル質形成にオートファジーが関わっていることも示された。

広範囲でのギャップ結合や AGJ の変動を知るためにエナメル芽細胞に存在することの知られているギャップ結合タンパク質 Cx43 の免疫組織化学と F-actin の組織化学を行った。注目した点はエナメル芽細胞の細胞間結合装置であった。この中に含まれるアドヘレンス結合 (接着帯) に多数の F-actin が集積することから (Nishikawa and Kitamura, 1986)、F-actin パターンについて蛍光ファロイジンを用いて調べた。この結合装置は分化期の後半から近位部と遠位部の両方に見られる。そこで、この両方の部位での F-actin と Cx43 の局在を調べた。分化期の内エナメル上皮を細胞が横断するように切片を作製し、細胞近位端を観察した。中間層細胞が強いアクチン蛍光を示し、内エナメル上皮細胞の近位部細胞間結合装置に接して F-actin が密集して見られるが、まだ規則的なリング状

には見えなかった (図 3b, c)。それに対応して Cx43 も同じ部位に濃縮して見られるが規則性に乏しかった (図 3a, c)。エナメル質内層を形成する時期になると、中間層細胞の周囲に強い F-actin の規則的な蛍光を示し、エナメル芽細胞近位部の細胞間結合装置に一致して均一なリング状の F-actin 蛍光が見られた (図 3e, f)。しかし、その方向によって F-actin 蛍光の強度は変わっていなかった。小型の点状の Cx43 蛍光が細胞間に見られた (図 3d, f)。分化期では核周囲の細胞間にも Cx43 蛍光が多く見られたが、基質形成期では核周囲にはわずかに見られるだけであった (図 3a, d)。

一方、細胞遠位端では、内層を形成するエナメル芽細胞の遠位部細胞間結合装置に、梯子状の F-actin 蛍光が見られたが (図 4b, 図 5d, f)、同様の梯子状のパターンがエナメル質を形成していない分化期内エナメル上皮細胞で見られた (図 5b)。Cx43 蛍光は内層形成期では F-actin と同様梯子状のパターンを示すが、分化期ではほとんど見られないか不規則な分布を示した (図 4a, 図 5a, c)。外層を形成するエナメル芽細胞に移行する少し前で Cx43 蛍光の大きな斑点 (1  $\mu\text{m}$  以上) が多数みられた (図 4c, 図 5e)。その後、内層から外層への移行期、外層形成期および成熟期エナメル芽細胞 (刷子縁を持つもの) では細胞間に Cx43 蛍光が点状に観察された (図 4d, e, f, 図 5g, h)。

## 考 察

ギャップ結合は細胞間コミュニケーションのための構造である。多細胞生物ではその発生中や、組織全体としての機能、あるいは細胞の恒常性に重要な役割を果たしていると考えられる (Thévenin et al., 2013)。通常の電子顕微鏡またはフリーズフラクチャー法による観察からは細胞間にパッチ上にギャップ結合が観察される。エナメル芽細胞でも多数のギャップ結合があることが報告され、また Cx43 の存在も報告されている (Warszawsky, 1978; Sasaki et al., 1981; Kagayama et al., 1995; Inai et al., 1997)。また、Cx43 の変異マウスではエナメル質形成に異常が起こり、ヒトでも Cx43 の突然変異は oculodentodigital dysplasia (ODDD) の原因となりエナメル質形成異常をきたす (Toth et al., 2010; Porntaveetus et al., 2017)。今回の研究では、分化期内エナメル上皮細胞や基質形成期と成熟期エナメル芽細胞に多数の AGJ が認められた。AGJ はギャップ結合の改変に伴う細胞内への取り込みとその後の破壊に関わっている (Thévenin et al., 2013)。Cx43 免疫組織化学で見られた直径 1  $\mu\text{m}$  以上の大きな斑点は、恐らく AGJ を示していて、エナメル質内層形成細胞から外層細胞への変換に伴う細胞間コミュニケーションの改変を見ていられると思われる。この改変はエナメル芽細胞

の細胞運動様式がエナメル質内層形成と外層形成とで異なっていることに関わるかもしれない (Nishikawa, 2017)。AGJ は直接リソソームにより、またはオートファゴソームを介して分解される (Thévenin et al., 2013)。エナメル芽細胞でオートファジーが見られたことは、このプロセスがエナメル質形成でも働いていると考えられる。今回観察された多数の AGJ はエナメル質形成に伴って、細胞が盛んにコミュニケーションの相手を換えていて、そのことがエナメル質形成にとって重要であることを示唆している。

## 謝 辞

電子顕微鏡標本の作製については、井関八郎氏にお世話になった。ここに深甚の謝意を表す。

## 参考文献

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015) *Molecular Biology of the Cell*, 6<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York, USA.
- Fong JT, Kells RM, Gumpert AM, Marzillier JY, Davidson MW, Falk MM (2012) Internalized gap junctions are degraded by autophagy. *Autophagy* 8:794-811.
- Fried K, Mitsiadis TA, Guerrier A, Haegerstrand A, Meister B (1996) Combinatorial expression patterns of the connexins 26, 32, and 43 during development, homeostasis, and regeneration of rat teeth. *Int J Dev Bio.* 40:985-995.
- Inai T, Nakamura K, Kurisu K, Shibata Y (1997) Immunohistochemical localization of connexin43 in the enamel organ of the rat upper incisor during ameloblast development. *Archs Histol Cytol* 60:297-306.
- Kagayama M, Akita H, Sasano Y (1995) Immunohistochemical localization of connexin 43 in the developing tooth germ of rat. *Anat Embryol* 191:561-568.
- Laird DW (2010) The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 20:92-101.
- Nishikawa S (2017) Cytoskeleton, intercellular junctions, planar cell polarity, and cell movement in amelogenesis. *J Oral Biosci* 59: 197-204.
- Nishikawa S, Kitamura H (1986) Localization of actin during differentiation of the ameloblast, its related epithelial cells and odontoblasts in the rat incisor using NBD-phalloidin. *Differentiation* 30:237-243.

annular gap junction の分布と Cx43 の変動

- Porntaveetus T, Srichomthong C, Ohazama A, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V (2017) A novel GJA1 mutation in oculodentodigital dysplasia with extensive loss of enamel. *Oral Diseases* 23:795–800.
- Sasaki T, Garant PR (1986) Fate of annular gap junctions in the papillary cells of the enamel organ in the rat incisor. *Cell Tissue Res* 246:523-530.
- Sasaki T, Higashi S, Tachikawa T, Yoshiki S (1981) Morphogenesis of gap junctions in rat amelogenesis. *J Electron Microsc* 30:191-197.
- Thévenin AF, Kowal TJ, Fong JT, Kells RM, Fisher CG, Falk MM (2013) Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology* 28:93-116.
- Toth K, Shao Q, Lorentz R, Laird DW (2010) Decreased levels of Cx43 gap junctions result in ameloblast dysregulation and enamel hypoplasia in *Gja1<sup>Jrt/+</sup>* mice. *J Cell Physiol* 223:601-609.
- Warshawsky H (1978) A freeze-fracture study of the topographic relationship between inner enamel-secreting ameloblasts. *Am J Anat* 152:153-208.

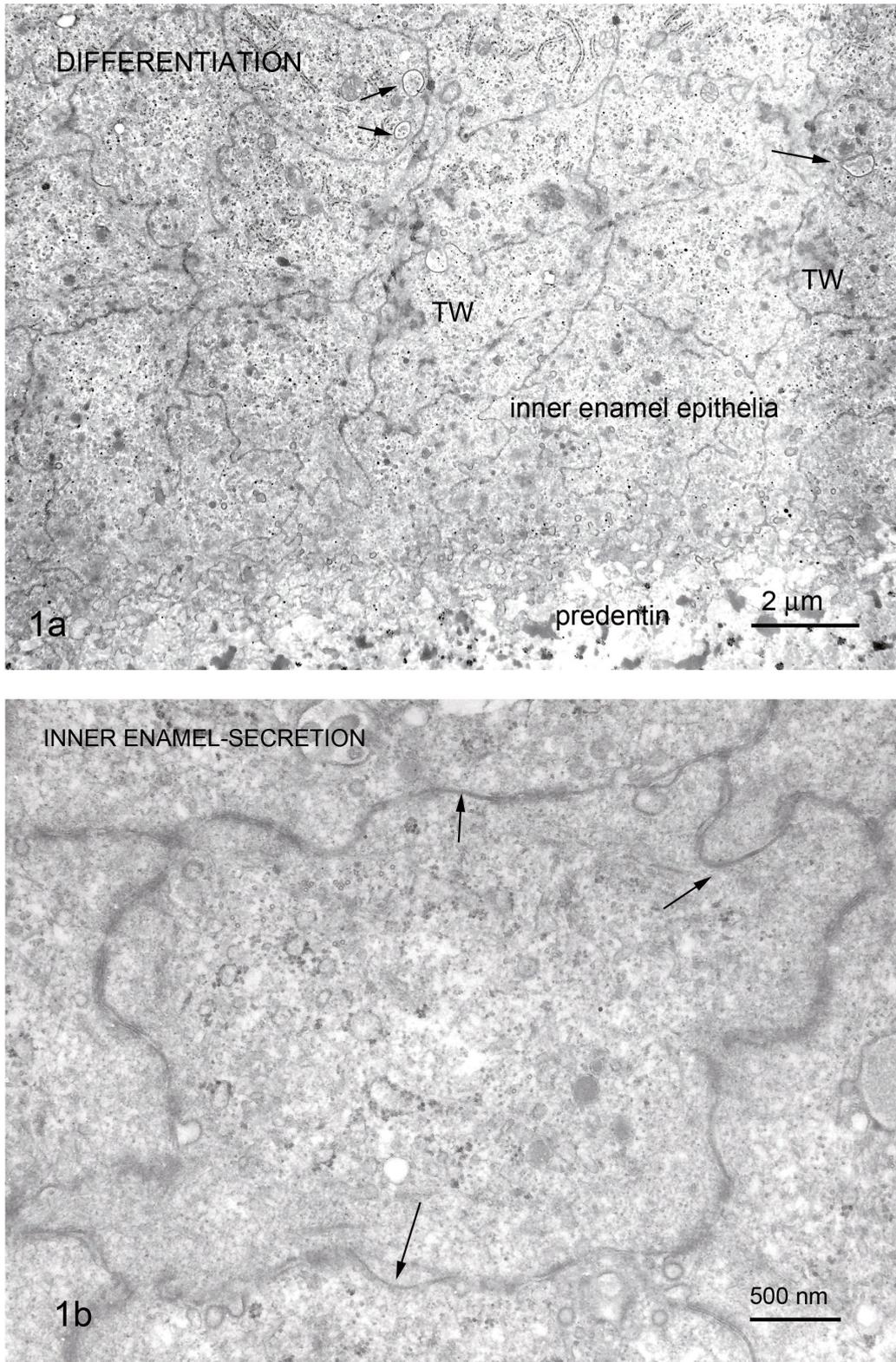


図1 (a) 分化期内エナメル上皮細胞 (DIFFERENTIATION) の横断面。遠位部の象牙前質 (preentin) に近い部分で細胞間結合装置についているアクチン線維束 (TW) が見える。複数の annular gap junction (AGJ) (矢印) がみられる。(b) エナメル質内層を形成する基質形成期エナメル芽細胞 (INNER ENAMEL-SECRETION) のトームス突起基部。細胞の横断像。矢印はギャップ結合を示す。

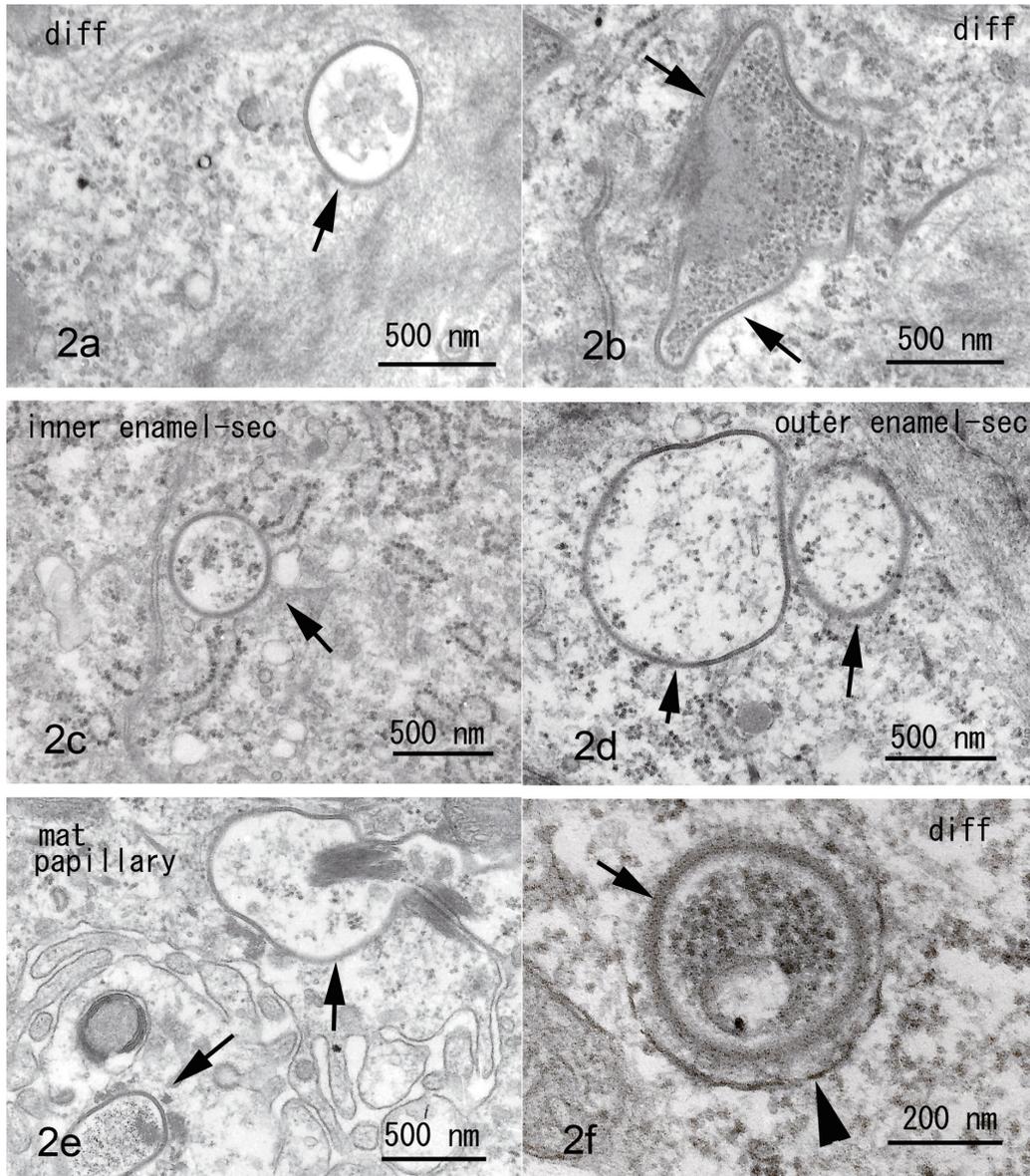


図2 さまざまなAGJ(矢印)を示す。(a、b、f)分化期内エナメル上皮細胞(diff)。(c)エナメル質内層を形成する基質形成期エナメル芽細胞(inner enamel-sec)。(d)エナメル質外層を形成する基質形成期エナメル芽細胞(outer enamel-sec)。(e)成熟期エナメル芽細胞に面した乳頭層細胞(mat papillary)。(a)遠位部細胞間結合装置近くに見られたAGJ。内容物はやや明るく見える。(b)AGJの形が内側に凹んでいて、内容物がリボソーム様に暗く見える。低分子の流失があるように見える。(c、d)いずれも内容物が明るいAGJが見られる。(e)トノフィラメントを取り込んでいる形成途中のAGJ。(f)オートファジーにより取り込まれようとしているAGJ(矢印)が見られる。オートファジーの膜を矢頭で示す。

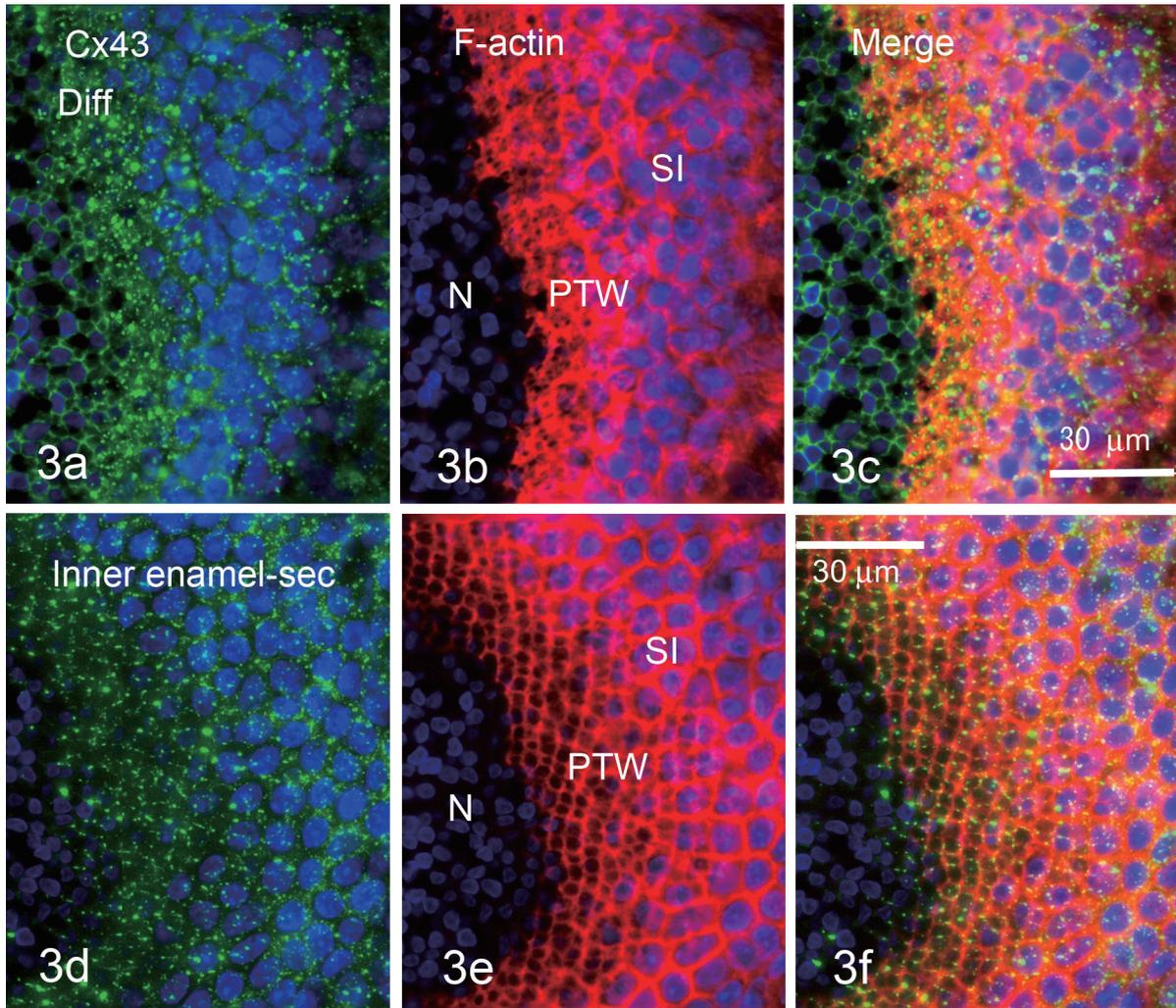


図3 Cx43 (緑色、a、c、d、f) と F-actin (赤色、b、c、e、f)。近位部細胞間結合装置を示す。青色は Hoechst33342 で DNA を標識したもので、核 (N) の局在を示す。(c) と (f) は 3 種類の標識を重ねたもの。分化期内エナメル上皮 (Diff) (a-c) とエナメル質内層を形成する基質形成期エナメル芽細胞 (Inner enamel-sec) (d-f) の近位部結合装置 (PTW) と中間層細胞 (SI)。近位部細胞間結合装置はエナメル質形成が始まってリング状の F-actin 分布を示すが (e)、分化期内エナメル上皮では不明瞭である (b)。

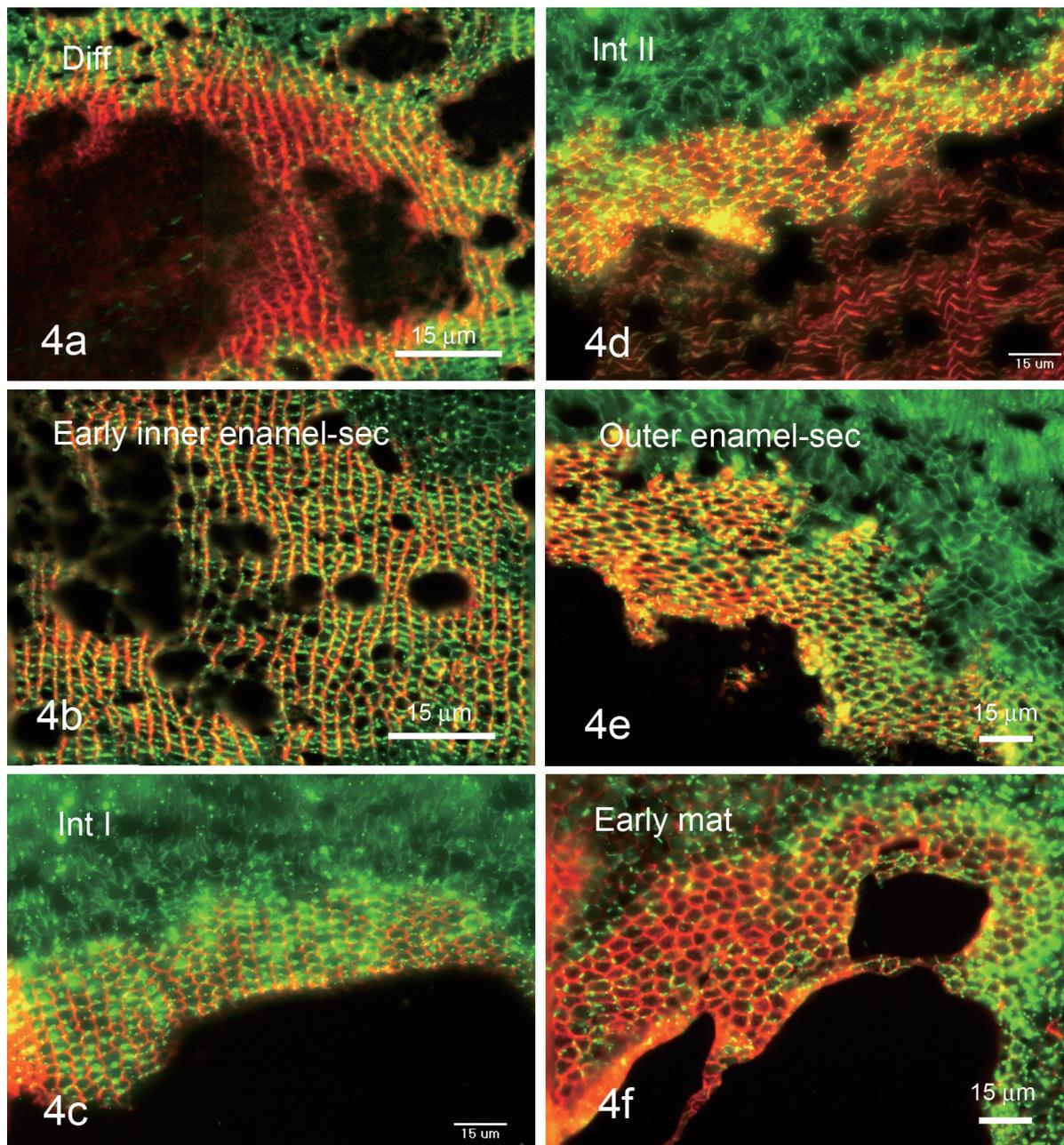


図4 Cx43 (緑色) と F-actin (赤色) の2重標識。遠位部細胞間結合装置を示す。(a) 分化期内エナメル上皮 (Diff)。F-actin は形成期と同じ異方性の分布を示すが、Cx43 はまだ一部しか結合装置に入っていない。(b) エナメル質内層を形成する基質形成期エナメル芽細胞 (Inner enamel-sec)。F-actin と Cx43 の分布がほぼ重なっていて結合装置にギャップ結合が参入していることを示唆している。(c) 内層形成の後半の基質形成期エナメル芽細胞 (Int I)。結合装置の F-actin 分布から離れる大きな斑点状の Cx43 の蛍光が見られ、これは AGJ を示すと思われる。(d) 内層形成期と外層形成期の中間の基質形成期エナメル芽細胞 (Int II)。外層形成期エナメル芽細胞の F-actin パターンと内層形成期エナメル芽細胞のトームス突起配列パターンを示す。Cx43 は再び F-actin パターンと一致し、ギャップ結合が結合装置の中に見られることを示唆している。(e) エナメル質外層を形成する基質形成期エナメル芽細胞 (Outer enamel-sec)。F-actin パターンと一致する Cx43 分布を示す。(f) 成熟期エナメル芽細胞 (Early mat)。刷子縁を持つ細胞。F-actin は細胞遠位端に広がっていて、刷子縁にアクチン線維が入っていることを示唆する。F-actin は細胞間結合装置にも見られる。Cx43 は細胞間結合装置に局限している。

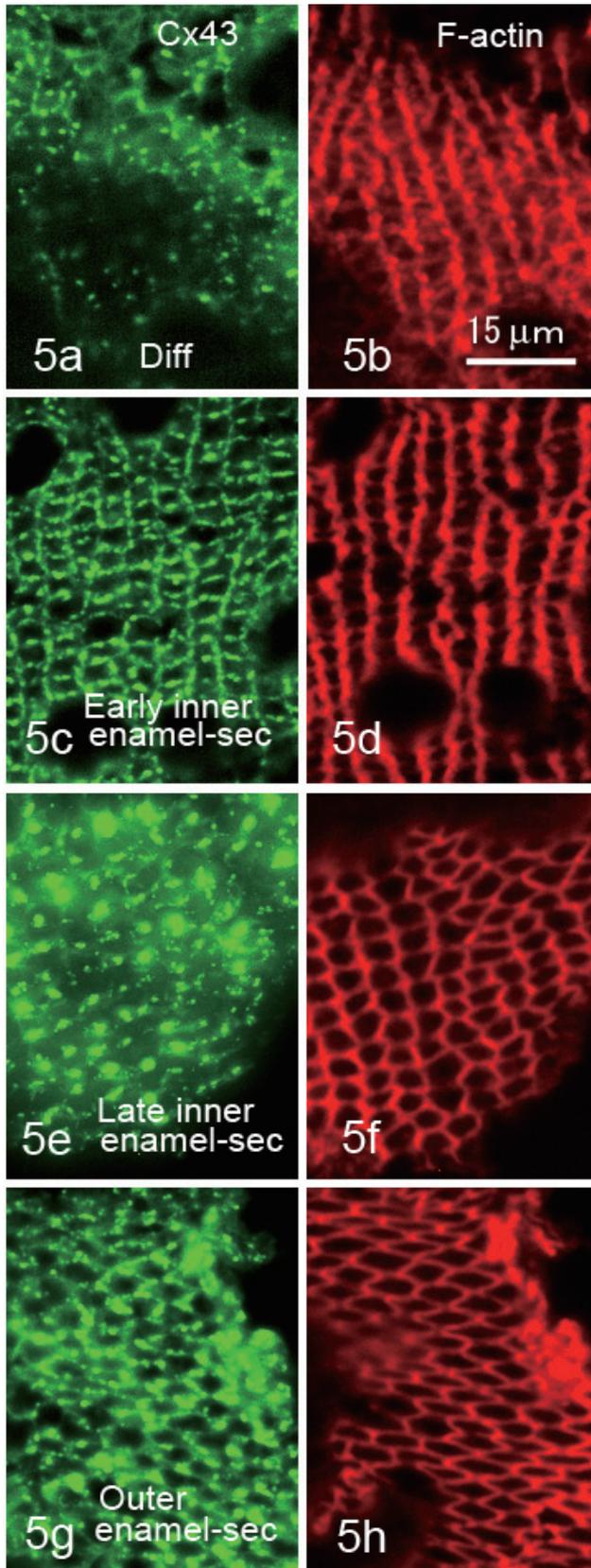


図5 図4と同じ二重標識した内エナメル上皮と形成期エナメル芽細胞の遠位部細胞間結合装置とそこに関わるCx43 (a, c, e, g) とF-actin (b, d, f, h) の分布。(a, b)、(c, d)、(e, f)、および (g, h) はそれぞれ図4a、4b、4c、および4eの一部をCx43蛍光とF-actin蛍光を分けて拡大したものである。但し、(c, d) は4bの左右を反転し、(g, h) は4eの上下を逆にしている。Cx43では分化期 (Diff) (a) には未熟な散発的な点状パターン、内層エナメル質形成初期 (Early inner enamel-sec) (c) には梯子状のギャップ結合パターン、内層形成から外層形成の移行期 (Late inner enamel-sec) (e) には大きな斑点状パターンに変化し、外層形成期 (Outer enamel-sec) (g) には六角形周囲に小さな点状のギャップ結合パターンに変化している。一方F-actinでは分化期 (b) にはすでに内層形成の異方性パターンで、内層エナメル質形成初期 (d) にはそれが持続し、内層形成から外層形成の移行期 (f) には四角形で等方性パターンになり、外層形成期 (h) には外層形成期特有の六角形の等方性パターンになっている。

西川 純雄  
〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見2-1-3  
鶴見大学歯学部生物学的研究室

Sumio Nishikawa  
Department of Biology  
Tsurumi University School of Dental Medicine  
2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501  
Japan  
E-mail: nishikawa-s@tsurumi-u.ac.jp