

エナメル質の横紋形成メカニズムの解明

及川 愛, 大津 圭史*, 藤原 尚樹, 石関 清人,
中富 満城**, 大島 勇人**, 原田 英光

岩手医科大学解剖学講座発生生物・再生医学分野

(主任: 原田 英光 教授)

*岩手医科大学先進歯科医療研究センター

(研究センター長: 木村 重信 教授)

**新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野

(主任: 大島 勇人 教授)

(受付: 2011年12月19日)

(受理: 2012年1月6日)

エナメル質の基本構造をなすエナメル小柱には横紋が観察される。この横紋は概日リズムを刻んだ成長線のひとつとして知られているが、形成メカニズムについては様々な説がある。非脱灰凍結切片で基質形成期のエナメル基質を抗アメロゲニン抗体で免疫染色すると横紋様パターンを示した。この結果から、横紋は基質形成期のアメロゲニンのタンパク量に依存した石灰化パターンであり、アメロゲニンの発現は概日的に変動するのではないかと推測した。そこで、アメロゲニンの発現に周期があるか観察するために、アメロゲニンプロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだコンストラクト(pGL3-1730-luc)をラットエナメル芽細胞株 HAT7 に遺伝子導入してアメロゲニンの転写活性を計測したところ、一定の周期をもって変動することが認められた。次に、プロモーター領域の Deletion-mutant (pGL3-464, -74, -48-luc) を作製して周期性の制御に関わる領域を検索した結果、C/EBP α の binding モチーフが有力な候補と考えられた。その転写は Msx2 によって制御を受けることが知られていることから、Msx2 の発現

Elucidation of enamel cross-striation formation mechanism

Ai SASAKI-OIKAWA, Keishi OTSU*, Naoki FUJIWARA, Kiyoto ISHIZEKI, Mitsushiro NAKATOMI**, Hayato OHSHIMA**, Hidemitsu HARADA

Division of Developmental Biology and Regenerative Medicine, Department of Anatomy, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Hidemitsu HARADA)

*Advanced Oral Health Science Research Center, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Shigenobu KIMURA)

**Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Chief: Prof. Hayato OHSHIMA)

2-1-1, Nishitokuta, Yahaba, Iwate, 028-3694, Japan

*19-1, Uchimaruru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

**2-5274, Gakkocho-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8514, Japan

ベクターを用いた強制発現の影響を調べたところ、そのリズムが消失した。また *Msx2* の遺伝子欠損マウスには基質形成の横紋様パターンが見られなかった。以上の結果から、*Msx2* がアメロゲニンの発現周期に影響していることが推測され、さらにアメロゲニンの発現量の周期的変化によって生じた基質形成パターンが、横紋形成に関与していると考えられた。

緒 言

歯は、骨などと異なって組織の改造現象が生じないため、生体の代謝変化が成長線として記録される^{1,2)}。エナメル質の基本構造をなすエナメル小柱には“横紋”と呼ばれる周期的な構造物が観察される。これは概日リズムを刻んだ成長線のひとつとして知られているが、その形成過程については様々な説がある。Boyde は、エナメルタンパクの分泌期にあるエナメル芽細胞の突起、すなわちトームス突起が周期的に形態を変化させるために生じたとする仮説を提唱している³⁾。Simmer らは、エナメルタンパクの発現量を組織学的に定量した結果、概日的に変動することを報告しており、横紋はエナメル芽細胞によるエナメル基質タンパクの分泌の概日リズムにより形成されると考えている^{1,4)}。そこで我々はエナメルタンパクの95%を占めるアメロゲニンについてその発現に周期性があるかを検討し、さらにその周期性の分子制御機構を解明することを目的に本研究を計画した。

マウスのアメロゲニンの発現を制御するプロモーターについては、Zhou らによって詳細に調べられている^{5,6)}。転写開始部位の上流約-2000bpにはCCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) 結合領域が数多く存在する。このC/EBP α 結合領域は基本的なプロモーター活性にとって不可欠な領域であり、C/EBP α の強制発現によってアメロゲニンタンパクレベルを上昇させることが報告されている。さらに、*Msx2* は、タンパク質間相互作用によりマウスアメロゲニンミニマルプロモーターのサイトにC/EBP α が結合するのを妨げることによってアメロゲニンの転写活性を抑制することが知られている⁶⁾。この結果は *Msx2* 遺伝子欠損マウスで、*Msx2* の発現とエナメルタンパクの分泌レ

ベルが正反対の関係にあることから明らかである⁷⁾。

この研究では、我々はアメロゲニンの発現において周期性があるか、さらにその周期性に関わる分子制御機構について検討した。

材 料 ・ 方 法

1. マウス切歯研磨標本の観察

生後6か月齢 ddY マウスの下顎切歯の研磨標本を作製した。頸椎脱臼にて屠殺後、下顎骨から切歯を取り出した。100 μ m厚さに砥石で研磨し、光学顕微鏡 (Olympus Com., Ltd, Tokyo, Japan) で観察した。なお、岩手医科大学動物実験委員会の承認を受け、岩手医科大学動物実験指針ならびに動物の保護および管理に関する法律に従って実施した。

2. マウス切歯エナメル基質の免疫染色

生後5日齢 ddY マウス切歯無固定非脱灰凍結切片を作製した。マウス頭部を SCEM (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で包埋し、ヘキサンドライアイス法で急速凍結した。試料はクリオスタット (Leica) を用いて6 μ m厚さにフィルムトランスファー法⁸⁾で切片を作製した。抗アメロゲニン抗体 (広島大学内田隆先生より供与) と標識2次抗体 Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を用いて免疫染色を行い、エナメル基質を蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) で観察した。

3. 細胞培養とレポーター遺伝子を用いたアメロゲニンの転写活性の測定方法

細胞はラットエナメル芽細胞株 HAT7 を用いた⁹⁾。細胞は、10%血清 (FBS) とペニシリン/ストレプトマイシン (100 units/ml) 入り DMEM/F-12 培地 (Invitrogen, Tokyo, Japan) で、5% CO₂, 37°C 下で培養した。細胞が3 cm 培養皿に80%コンフルエントの状態、レポーター遺伝子2 μ gを Lipofectamine LTX と

plus reagent (Invitrogen) で遺伝子導入した。24 時間後に 0.1mM Forskolin (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 入り DMEM 培地で細胞を同期させた。0.1mM luciferin を加えてアメロゲニンの転写活性を観察した¹⁰⁾。また、アメロゲニンの転写活性の特徴について他のプロモーターと比較検討するために、TCF-lef 系の転写活性を調べる TOP-flash¹¹⁾ (EMD Millipore, KGaA of Darmstadt, Germany) を用いた。単一細胞の発光の変化を OLYMPUS LV200 (Olympus Com. Ltd. Tokyo, Japan) を用いて高感度 CCD カメラで撮影した¹²⁾。1 分間露光し、30 分おきに 2 日間撮影した。さらに、その撮影データをもとに MetaMorph (Molecular Devices, LLC) を用いて発光量を定量して、撮影開始点を 1 としたときの相対的な発光強度をグラフにした。また、RFP (fucci orange) の撮影は 0.5 分で行った。

4. Deletion-mutant のコンストラクトの作製

レポーター遺伝子であるルシフェラーゼを繋いだアメロゲニンプロモーターは、Zhou らの研究⁵⁾ で記述されたように、ラットのゲノム情報に従って組み立てられた (GenBankTM accession number NW_048039)。レポーター遺伝子は、ラットアメロゲニンプロモーターの上流から -1730bp-exon1-intron1 の配列を 3' (Nhe1) -5' (Xho1) にて pGL3 Luciferase Reporter Vector (pGL3-Basic, Promega, USA) のマルチクローニングサイトに挿入して作製した¹³⁾。また、リズムを刻む発現領域を検索するためにアメロゲニンプロモーターの Deletion-mutant (pGL3-1730, -464, -74, -48-luc) を作製して同様に観察した¹³⁾。Deletion-mutant は P-2694 をテンプレートとして PCR によって増幅して作製した。このプロトコールを使ったプライマーは次のようにデザインされた。

P-2694, forward 5'-CAGACTTGCTAGCGTCA
TTTGGAATGAATGTATAAC-3'

pGL3-74, forward 5'-CAGACTTGCTAGCTTC
ATTCTGAAACCTGATTGGCT-3'

pGL3-48, forward 5'-CAGACTTGCTAGCCTA

AGTGCCCTGCATGGTATAAAA-3'

ヌクレオチドはプライマーに組み込まれた Nhe1 サイトに存在する。

共通のリバースプライマーは以下のようにデザインした。

5'-ATCGACTCGAGACATACCTTGAGTGTA
TGCTCAGTG-3'

ヌクレオチドは Xho1 サイトに存在する。pGL3-Basic Vector (Promega) に Nhe1 と Xho1 サイトに挿入した。P-2694 配列は P-1730 点に Nhe1 サイトを含むので、P-1730 フラグメントは P-2694/Nhe1, Xho1 からデザインされた。Msx2 の発現ベクターは西村理行先生 (大阪大学) より供与された¹⁴⁾。また、細胞周期をモニターするために Fucci 遺伝子である pFucci-G1 Orange (Medical & Biological Laboratories Co., LTD., Nagoya, Japan) を用いた。

5. Msx2 遺伝子欠損マウスの解析

Msx2 遺伝子欠損マウスの切歯の組織切片は新潟大学大島勇人先生より供与された。遺伝子型については過去の通法に従って行った¹⁵⁾。生後 0 日齢 Msx2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの下顎骨より取り出した切歯を 4% PFA で固定して、通法に従って切片を作製し、0.1% トルイジンブルーで染色した後に光学顕微鏡で観察した。

結 果

1. エナメル基質におけるアメロゲニンタンパクの免疫染色パターン

我々は、エナメル基質におけるアメロゲニンの局在を確認するためにマウス下顎切歯の無固定非脱灰凍結切片を作製し、基質形成時のアメロゲニンタンパクの免疫染色を行った (図 1 A, B)。その結果、エナメル基質には横紋に類似した周期的な染色パターンが観察された (図 1 C, D)。

2. アメロゲニンの転写活性の経時的変化

アメロゲニンの周期的な染色パターンが、エナメル芽細胞におけるアメロゲニンの発現に関

連しているかどうかを検討するために、ラットエナメル芽細胞株 HAT7 を用いてアメロゲニンの転写活性を経時的に観察した。pGL3-1730-luc を HAT7 に遺伝子導入し、その発光を 30 分おきに高感度 CCD カメラで撮影した。培養された細胞の中から無作為に 5 つの細胞を抽出して発光量の変化を経時的に調べた。その中の代表的なデータを図に示す (図 2 A)。また、pGL3-1730-luc での発光の変化を TOP-flash を遺伝子導入したレポーターアッセイの経時変化と比較検討した (図 2 C)。さらに、その撮影データをもとに MetaMorph (Molecular Devices, LLC.) を用いて発光量を定量してグラフにした (図 2 B)。無作為に抽出した細胞の

最大強度の間隔を測定したところ、 22.8 ± 3.35 時間 ($n = 5$) の周期でアメロゲニンの転写活性が変動することが明らかとなった。48 時間以内にピークが 2 回、開始点から 1.5 以上発光強度が変化するものを周期とした。TOP-flash では転写活性が 20-22 時間でピークを迎えるが周期的な変動が観察されなかった (図 2 D)。

3. アメロゲニン転写活性にリズムがあるときの細胞分裂の停止

アメロゲニンの転写活性の周期性が細胞の分裂による影響を受けていないことを確認するために、細胞周期をモニタリングする Fucci の発現ベクターを同時に遺伝子導入して、転写活性と細胞周期との関係を検討した。アメロゲニン

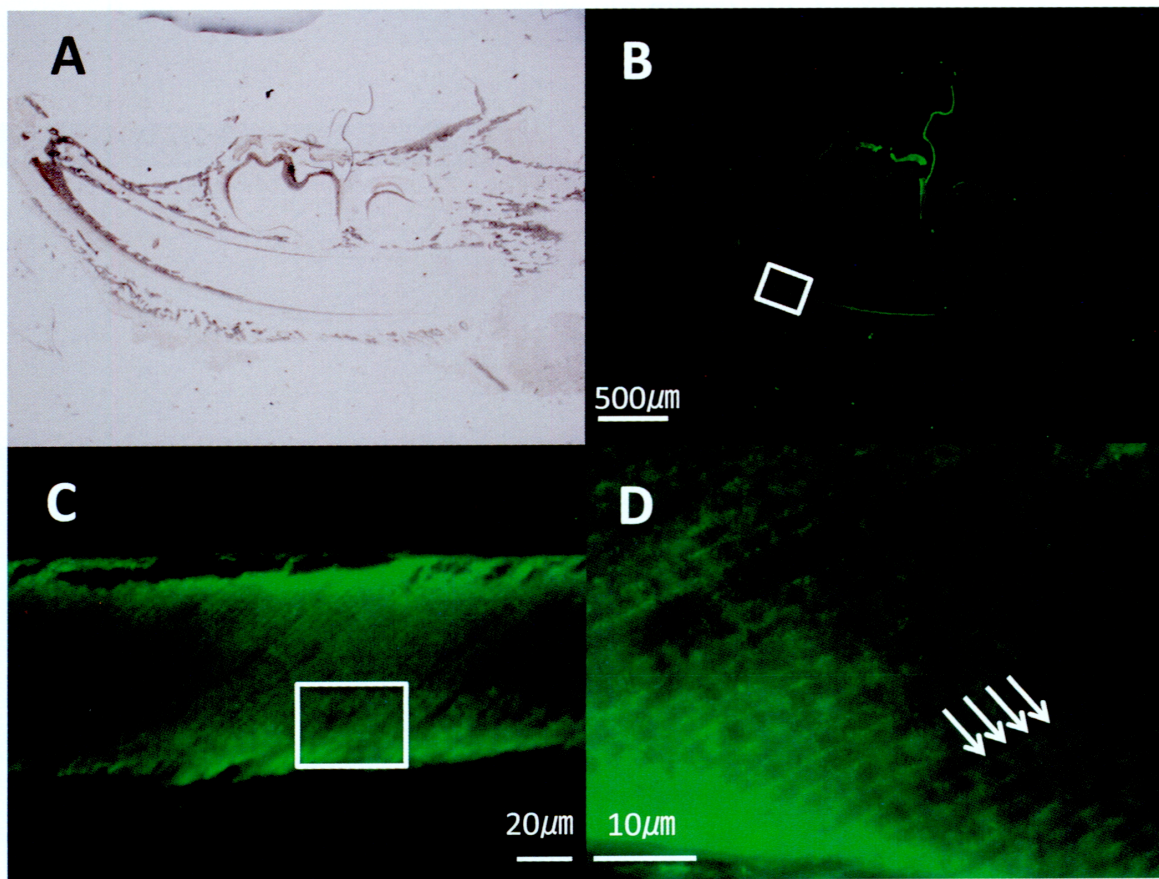


図 1 エナメル基質のアメロゲニン免疫染色パターン
 (A) 生後 5 日齢のマウス下顎の無固定未脱灰凍結切片における明視野像。
 (B) マウス下顎におけるアメロゲニンの免疫染色。
 (C) (B) の白枠で囲んだ領域の拡大像を示す。
 (D) (C) の白枠で囲んだ領域の拡大像。矢印で示すように、横紋様の約 $6.6\mu\text{m}$ の等間隔のラインが観察される。

の転写活性は図 2 Bと同様に 24 時間の変動が認められたが (図 3 A, B), *fucci orange* の強弱には特に変動はなかった (図 3 C, D).

4. アメロゲニンの転写活性リズムを制御する領域の検索

アメロゲニンの発現領域の中でリズムを制御する領域を検索するために、プロモーター領域の Deletion-mutant を作製し HAT7 に遺伝子

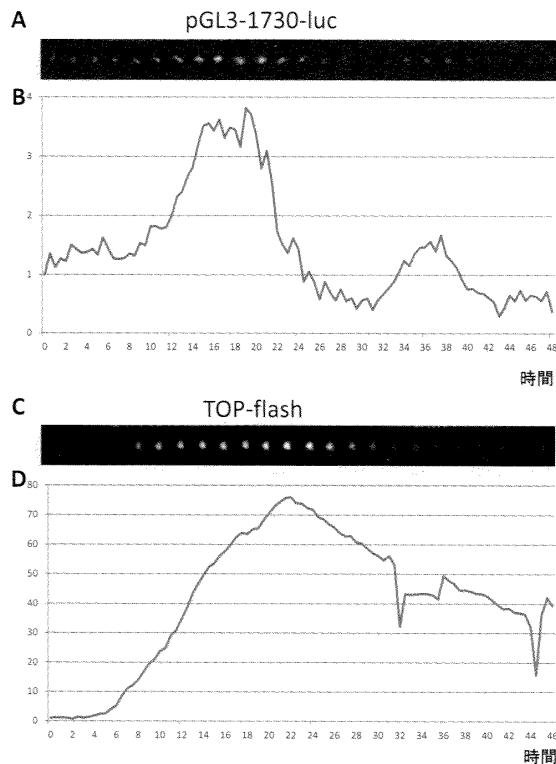


図 2 HAT7 に pGL3-1730-luc を遺伝子導入したときのアメロゲニン転写活性 (A, B) と, TOP-flash の転写活性 (C, D)

- (A) HAT7 における発光の経時的な撮影像。
 (B) (A) における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始を 1 としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。22.8 ± 3.35 時間周期で転写活性が変動している。
 (C) TOP-flash を導入した時の HAT7 の経時的な発光撮影像。
 (D) (C) における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を 1 としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。転写活性を認めたが、周期的なリズムは観察されなかった。

導入して、pGL3-1730-luc と同様に観察した。pGL3-464-luc (図 4 A, B) では 24.4 ± 3.00 時間 (n = 5), pGL3-74-luc (図 5 A, B) では 25.8 ± 3.78 時間 (n = 5) の周期を認めたが、pGL3-48-luc では発光せず、転写活性を認めなかった (data not shown)。

5. *Msx2* の強制発現がアメロゲニンの転写活性に及ぼす影響

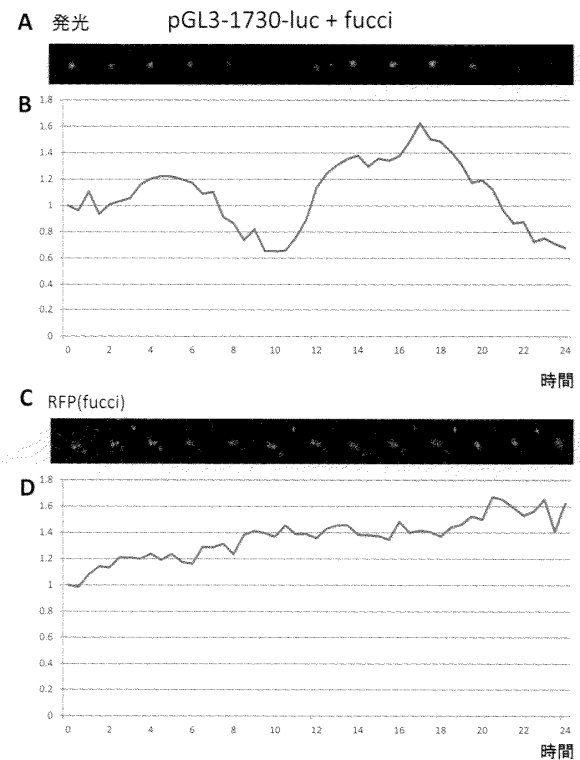


図 3 アメロゲニン転写活性にリズムがあるときの細胞分裂の停止

- (A) HAT7 における発光の経時的な撮影像。発光が 24 時間周期で変動している。
 (B) (A) における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を 1 としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。24 時間周期で転写活性が変動している。
 (C) 細胞が赤色に蛍光を発している。fucci orange の強弱には特に変動はなかった。
 (D) (C) における経時的な撮影像から蛍光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を 1 としたときの蛍光強度の比、横軸は時間を示す。蛍光の強弱に変動はなかった。

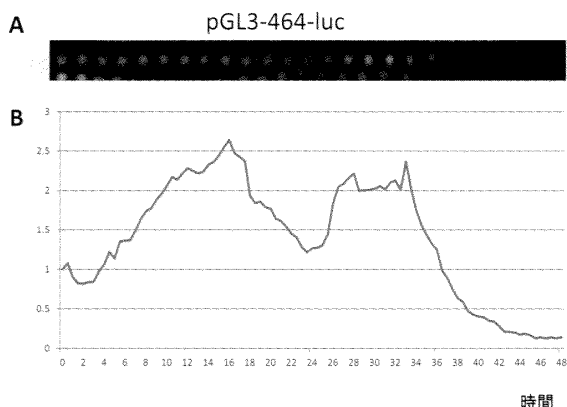


図4 HAT7にpGL3-464-lucを遺伝子導入したときのアメロゲン転写活性
(A) HAT7における発光の経時的な撮影像。
(B) (A)における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を1としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。24.4 ± 3.00時間周期で転写活性が変動している。

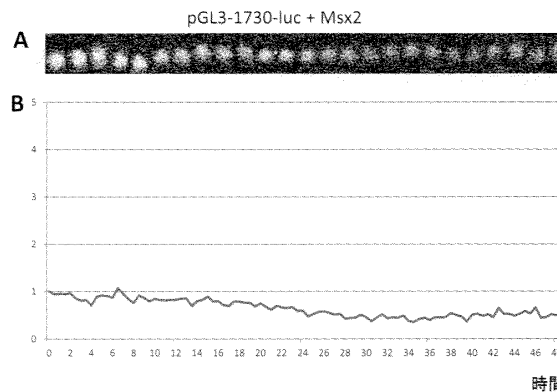


図6 Msx2の強制発現によるアメロゲンの転写活性
(A) HAT7における発光の経時的な撮影像。
(B) (A)における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を1としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。Msx2の強制発現により、アメロゲン転写活性のリズムが消失した。

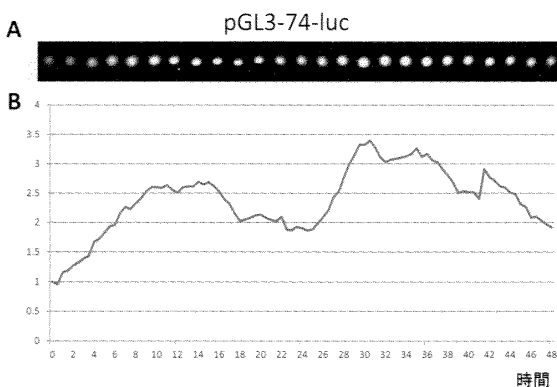


図5 HAT7にpGL3-74-lucを遺伝子導入したときのアメロゲン転写活性
(A) HAT7における発光の経時的な撮影像。
(B) (A)における経時的な撮影像から発光量を定量したグラフ。縦軸は撮影開始点を1としたときの発光強度の比、横軸は時間を示す。25.8 ± 3.78時間周期で転写活性が変動している。

Msx2の発現が転写活性のリズムを制御する分子ではないかと推測し⁶⁾、レポーター遺伝子とMsx2の強制発現プラスミドを同時にHAT7に遺伝子導入して転写活性リズムを観察した。その結果、Msx2の強制発現により、発光の周期が消失した(図6 A, B)。

6. Msx2遺伝子欠損マウスの染色パターン

Msx2の発現が消失した場合、エナメル基質の形成にどのような影響があるかを確認するために、Msx2遺伝子欠損マウスのエナメル基質部位のトルイジンプルー染色を行った。野生型マウスのエナメル基質では横紋様の周期的パターンが観察されたが(図7 A)、一方、Msx2遺伝子欠損マウスのエナメル基質では、周期的パターンは観察されず、全体的に強く染色された(図7 B)。

考 察

生体の代謝変化は成長線としてエナメル質に記録される。エナメル小柱には、低石灰化の構造物がヒトでは約4μm間隔、マウスでは約6μm間隔で観察され¹⁾、“横紋”と呼ばれている。この横紋は歯の成長との関係から概日リズムとの関係が示唆されている⁴⁾。この横紋が形成されるメカニズムについては、エナメル芽細胞が概日的に形態を変化させた結果であるとするもの³⁾やエナメルタンパクの分泌量の周期的変化によるもの¹⁾、石灰化におけるカルシウムイオンの輸送の変化によるもの³⁾であるなど、様々な説がある。しかしながら、明確にこれを証明した報告はない。この研究では、エナメル基質

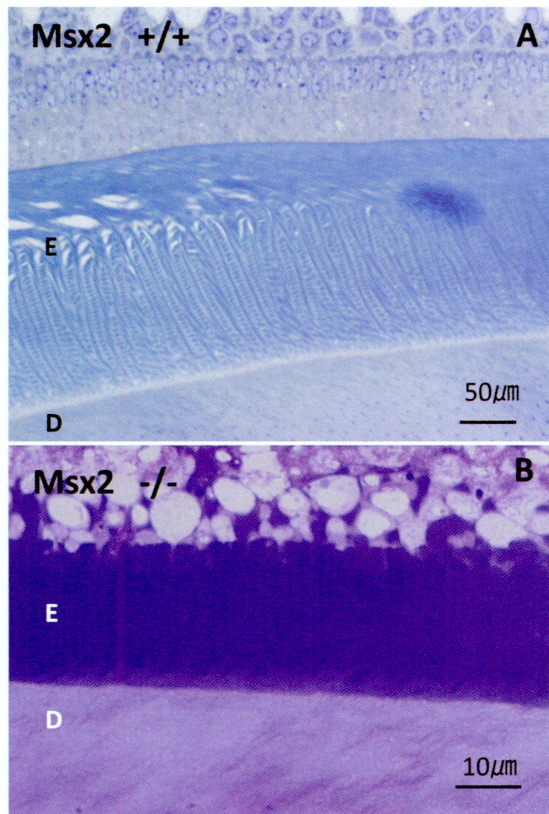


図7 野生型マウスと *Msx2* 遺伝子欠損マウスのトルイジンブルー染色 (E: エナメル基質, D: 象牙質)
 (A) 野生型マウス. エナメル基質に横紋様の約 $5.5\mu\text{m}$ の等間隔のラインが観察される.
 (B) *Msx2* 遺伝子欠損マウス. 横紋様のラインは観察されない.

を抗アメロゲニン抗体で免疫染色を行った結果, その染色パターンが周期的で, 横紋と一致することを見出した (図1 C, D). この結果は, 過去の論文¹⁾にあるマウスの横紋の間隔とはほぼ一致していた. このことより, エナメル芽細胞によるアメロゲニンの分泌が概日的に変動しているのではないかと考えた.

エナメル質形成の分泌期において, 内エナメル上皮はトームス突起をもったエナメル芽細胞に分化してエナメル器と歯乳頭の境界から後退しながらエナメルタンパクを分泌する. したがって免疫染色で観察された組織中のアメロゲニン量とエナメル芽細胞が一日に分泌するアメロゲニン量とが直接反映されているとは限らない. そこでエナメル芽細胞の一日の分泌量の変

化を調べるために, アメロゲニン転写活性をレポーターアッセイによって経時的に観察した. レポーター活性は 20~26 時間の周期で観察され, このことはアメロゲニンタンパクのリズミカルな発現が mRNA レベルで制御されていることを示唆している. この発現については, 細胞分裂の影響を受けている可能性が疑われる. そこで, 細胞周期をモニターする Fucci の発現ベクターと共にレポーター遺伝子を導入して, 細胞分裂が起きていないことを確認した. 今回の実験では細胞はコンフルエントの状態ので, Forskolin で分裂周期を同調させて行ったので, Fucci orange は恒常的に発現しており, G1/G0 期にある状態であることが確認できた. そのため, アメロゲニンの転写活性の周期性は, 細胞が分化した状態にあり細胞の分裂周期による影響を受けていないことが明らかとなった.

次にこの転写活性の周期性を制御している分子を特定するために, プロモーターの Deletion-mutant を作製して制御領域部位の決定を試みた. その結果, TATA box の上流の CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-binding site を含むミニマルプロモーター (70/52) を使用した時にもリズムが観察された. pGL3-1730, -464, -74-luc で発光強度のパターンが異なるのは, 個々の細胞によって遺伝子導入効率が異なるためであると考えられる. このことから, C/EBP α の結合領域がリズムを主体的に制御する領域であると考えられた. しかし, C/EBP α は恒常的に発現する転写因子であり, 概日リズムを制御している可能性は考えにくい. Zhou らは, ホメオボックス遺伝子産物である *Msx2* が C/EBP α に結合して転写を抑制することを報告している⁶⁾. そこで我々は *Msx2* の発現が転写活性のリズムを制御する分子ではないかと推測した.

上記の結果をふまえて, *Msx2* における過剰発現と遺伝的に欠損した場合でのアメロゲニンの発現についての実験を計画した. レポーター遺伝子と *Msx2* の強制発現プラスミドを同時に細胞に遺伝子導入して転写活性リズムを観察し

た。その結果、今まで観察されていた概日リズムが消失した。次に *Msx2* の発現が消失した場合にリズムがどうなるかを検討した。我々は *Msx2* 遺伝子欠損マウスにおけるエナメル基質を観察した。その結果、コントロールに見られたような明確な横紋様の染色パターンは消失していた。*Msx2* の遺伝子欠損は、アメロゲニンの転写活性が増強することが知られており、トルイジンブルーの染色が濃くなっているのはアメロゲニンタンパクの発現が上昇したためであると考えられる。以上をまとめると、アメロゲニン発現の概日リズムは *Msx2* の発現に依存していると考えられた。しかし、*Msx2* の発現リズムを調節する分子メカニズムについては本研究では明らかにできなかった。概日リズムは体内の代謝や様々な活動に関与しているため、時計遺伝子の研究をエナメルタンパク発現のメカニズムの解明に適用することができる¹⁶⁾。最近の研究では、時計リズムの period, amplitude, phase などのパラメーターを調節する遺伝子がネットワークを作り働いていることが明らかになっている¹⁷⁾。特に、エナメル芽細胞もまた時計遺伝子を発現していることが示されており^{1, 18)}、これらの遺伝子がアメロゲニン転写と関連していると考えられる。Athanassiou-Papaefthymiou らは時計遺伝子はその発現を制御している Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (*Nr1d1*) がアメロゲニン mRNA の発現に影響していることを報告した¹⁹⁾。しかしながら、*Nr1d1* が *Msx2* の発現に関与するかは現在のところ不明である。これらの時計遺伝子の制御する概日リズムがエナメル芽細胞のアメロゲニン分泌にどのような制御を行っているかはまだ不明な点が多く、今後の研究に待たれる。今回の研究で *Msx2* がアメロゲニンの転写活性の周期的変化に重要な影響を及ぼしていることを明らかにしたが、これらの時計遺伝子が *Msx2* の発現にどのようにかかわっているかについても、*Msx2* のプロモーター領域に直接結合する時計遺伝子も見つかっていないことから、*Msx2* の発現を制御する分子機構

は不明であり、今後の課題である。

基質形成における概日リズムの研究は薬物の代謝や器官の発生、生体の成長のメカニズムを理解する上で極めて重要であると考えられる。さらに歯はそれらの生体の変化が描記される唯一の器官であることから、この分野の研究の進展は代謝的な疾患の原因究明や効果的な治療法開発に大きな影響を及ぼすと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に対しご助言をいただきました旧歯科保存学第一講座久保田稔名誉教授、旧歯科保存学第一講座の諸先生方に心からお礼申し上げます。また、レポーターアッセイの実験にあたりご援助いただいた独立行政法人 物質・材料研究機構の谷口彰良先生、*Msx2* 遺伝子欠損マウスを供与して下さった里方一郎先生に深く感謝いたします。

この研究は、文部科学省科学研究費補助金 (C; No.19562128, B; No.19390466)、岩手医科大学オープンリサーチプロジェクト (2007-2011年) の補助金、岩垂奨学金 (岩垂育英会) で行った。

なお、この研究内容は、岩手医科大学歯学会第 69 回例会 (2010 年 2 月 27 日)、10th TMD (ドイツ・ベルリン、2010 年 9 月)、第 53 回歯科基礎医学会学術大会 (2011 年 10 月 1 日) にて発表した。

引用文献

- 1) Simmer, J.P., Papagerakis, P., Smith, C.E., Fisher, D.C., Rountrey, A.N., Zheng, L., and Hu, J.C. : Regulation of dental enamel shape and hardness. *J. Dent. Res.*, 89 : 1024-1038, 2010.
- 2) Ohtsuka, M., Saeki, S., Igarashi, K., and Shinoda, H. : Circadian rhythms in the incorporation and secretion of 3H-proline by odontoblasts in relation to incremental lines in rat dentin. *J. Dent. Res.*, 77 : 1889-1895, 1998.
- 3) Boyde, A. : Carbonate concentration, crystal centers, core dissolution, caries, cross striations, circadian rhythms, and compositional contrast in the SEM. *J. Dent. Res.*, 58(Spec Issue B) : 981-983, 1979.
- 4) Antoine, D., Hillson, S., and Dean, M.C. : The developmental clock of dental enamel: a test for the

- periodicity of prism cross-striations in modern humans and an evaluation of the most likely sources of error in histological studies of this kind. *J. Anat.*, 214 : 45-55, 2009.
- 5) Zhou, Y.L., and Snead, M.L. : Identification of CCAAT/enhancer-binding protein alpha as a transactivator of the mouse amelogenin gene. *J. Biol. Chem.*, 275 : 12273-12280, 2000.
 - 6) Zhou, Y.L., Lei, Y., and Snead, M.L. : Functional antagonism between Msx2 and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.*, 275 : 29066-29075, 2000.
 - 7) Molla, M., Descroix, V., Aioub, M., Simon, S., Castaneda, B., Hotton, D., Bolanos, A., Simon, Y., Lezot, F., Goubin, G., and Berdal, A. : Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in Msx2 mutant mice. *Am. J. Pathol.*, 177:2516-2526, 2010.
 - 8) Kawamoto, T. : Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch. Histol. Cytol.*, 66:123-143, 2003.
 - 9) Kawano, S., Saito, M., Handa, K., Morotomi, T., Toyono, T., Seta, Y., Nakamura, N., Uchida, T., Toyoshima, K., Ohishi, M., and Harada, H. : Characterization of dental epithelial progenitor cells derived from cervical-loop epithelium in a rat lower incisor. *J. Dent. Res.*, 83 : 129-133, 2004.
 - 10) Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y., and Hashimoto, S. : A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418 : 534-539, 2002.
 - 11) Lu, D., Zhao, Y., Tawatao, R., Cottam, H.B., Sen, M., Leoni, L.M., Kipps, T.J., Corr, M., and Carson, D. A. : Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 : 3118-3123, 2004.
 - 12) Asai, S., Takamura, K., Suzuki, H., and Setou, M. : Single-cell imaging of c-fos expression in rat primary hippocampal cells using a luminescence microscope. *Neurosci. Lett.*, 434 : 289-292, 2008.
 - 13) Xu, L., Harada, H., Yokohama-Tamaki, T., Matsumoto, S., Tanaka, J., and Taniguchi, A. : Reuptake of extracellular amelogenin by dental epithelial cells results in increased levels of amelogenin mRNA through enhanced mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.*, 281 : 2257-2262, 2006.
 - 14) Ichida, F. : Reciprocal roles of Msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279 : 34015-34022, 2004.
 - 15) Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R., and Maas, R. : Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.*, 24:391-395, 2000.
 - 16) Bass, J., and Takahashi, J. S. : Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 330 : 1349-1354, 2010.
 - 17) Zhang, E.E., and Kay, S.A. : Clocks not winding down: unraveling circadian networks. *Nature Rev. Mole. Cell Biol.*, 11 : 764-776, 2010.
 - 18) Zeng, L., Papagerakis, S., Schnell, S. D., Hoogerwerf, W. A., and Papagerakis, P. : Expression of clock proteins in developing tooth. *Gene Expr. Patterns*, 11 : 202-206, 2011.
 - 19) Athanassiou-Papaefthymiou, M., Kim, D., Harbon, L., Papagerakis, S., Schnell, S., Harada, H., and Papagerakis, P. : Developmental and circadian control of enamel formation. *Eur. J. Oral Sci.* (in press)

Elucidation of enamel cross-striation formation mechanism

Ai SASAKI-OIKAWA, Keishi OTSU*, Naoki FUJIWARA, Kiyoto ISHIZEKI,
Mitsushiro NAKATOMI**, Hayato OHSHIMA**, Hidemitsu HARADA

Division of Developmental Biology and Regenerative Medicine, Department of Anatomy, Iwate Medical University
(Chief : Prof. Hidemitsu HARADA)

*Advanced Oral Health Science Research Center, Iwate Medical University
(Chief : Prof. Shigenobu KIMURA)

**Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Department of Tissue Regeneration and
Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Chief : Prof. Hayato OHSHIMA)

[Received : December 19, 2011 : Accepted : January 6, 2012]

Abstract : In enamel rods, periodic bands referred to as 'cross-striations' are observed, and known as incremental lines of circadian rhythm. Though it is considered that the cross-striation is involved in the biological circadian rhythm during the secretion of enamel matrix protein by ameloblasts, the developmental mechanism involved has not been examined in detail. By immunostaining amelogenin in fresh frozen sections of mouse lower incisor, we could observe fluorescent periodic bands in the enamel matrix, which were identical to the pattern of these cross-striations. Accordingly, we focused on the biological rhythm in the section of amelogenin. We examined amelogenin mRNA transcriptional activity in an ameloblast cell line (HAT7) by using real-time luminescence microscopy. The results showed that amelogenin mRNA transcriptional activity exhibited periodic rhythmicity and that *Msx2* over-expression led to the disappearance of the periodic change. Further, in the lower incisors of *Msx2*-deficient mice, the periodic bands were not observed. Taken together, our findings suggest that the formation of cross-striations in the enamel rods was associated with the expression of amelogenin regulated by the transcriptional activity.

Key Words : enamel, amelogenin, cross-striation, circadian rhythm