

マラッセ上皮特異的遺伝子の単離－セメント質誘導因子単離に向けて－

西村 学子 [北海道医療大学歯学部／助手]

背景・目的

申請者は、当教室においてブタの歯根膜からマラッセ上皮細胞を *in vitro* で単離する方法を Burunette らの方法をもとに確立し、これまで、この細胞を用いた研究を行ってきた。マラッセ上皮は、口腔上皮と同じ扁平上皮細胞であることから、歯肉口腔上皮のモデル系として用いている報告もあるが、申請者の行ってきた研究では Ca^{2+} 非依存的な増殖能を示すなど、口腔上皮との特性の違いも明らかになってきている。本研究では、口腔上皮細胞との比較からマラッセ上皮細胞が特異的に発現している、あるいは強度に発現している一連の遺伝子を単離し、データベースからその機能を検索し、それらのセメント質形成の誘導や、歯根膜再生、恒常性維持への関与について考察することを目的とする。

内容・方法

(1) マラッセ上皮細胞特異的遺伝子の検索

ブタ歯根膜から単離したマラッセ上皮細胞と同部歯周口腔上皮から単離した口腔上皮細胞をケラチノサイト用無血清培地KBM(Clontech社)で培養を行った。それぞれの細胞よりRNAを抽出し、両者を用いて Differential Display (DD) 法によりマラッセ上皮細胞に特異的な遺伝子を同定・単離した。その遺伝子配列は PE310 Sequence analyzedにて検索した。

(2) 単離遺伝子の特異性の確認

マラッセ上皮細胞での特異性を確認するために、(1)で単離し決定した遺伝子の配列を基にプライマーを設計し RT-PCR 法により確認した。

(3) 全長cDNAのクローニング

(2) で応答が確認された遺伝子を RACE 法によって全長の cDNA を単離する。

(4) クローニングされた遺伝子のホモロジー検索

(3) で得られた遺伝子の Blast 検索を行い既存遺伝子とのホモロジーを調べ、遺伝子機能の予測を行う。

結果・成果

口腔上皮とマラッセ上皮の mRNA 発現を cDNA に逆転写の後、DD 法により比較検討した。その結果、今までのところマラッセ上皮のみでの発現を思わせるバンドが 16 本、マラッセ上皮で明らかな強発現を思わせるバンドが 34 本確認され

た。これらのバンドをアガロースゲルごと切り出し、再度同じプライマーを用いて PCR による增幅の後、Direct sequence により塩基配列を確認した。Blast 検索により、マラッセ上皮に特異性の高い遺伝子として small heat shock protein が候補に上がったため (Fig 1)、この遺伝子の情報から新たなプライマーをデザインし、再度 RT-PCR 法を行った。その結果、マラッセ上皮では明らかな発現が認められたものの、口腔上皮での発現はきわめて弱く、マラッセ上皮特異的遺伝子の一つと考えられた。その他、切り出されたバンドのほとんどは再現性に乏しく、口腔上皮とマラッセ上皮から total RNA 抽出後の RT-PCR で発現が確認されたものは 2 つのみであった。その 2 つはいずれも、Blast 検索により多くの範囲で homology のみられるものは確認されず、unknown のものと考えられた。

(Fig 1)

```
ttgaggcacc tcatagagat tccagtgcgt taccaggaag  
agtttgaagc  
tcgagggtcta gaagactgca ggctggatca tgctttat  
gcactgcctg  
ggccaaccat cgtggacctg aggaaaac
```

Direct sequence により得られた塩基配列。

これら配列と、small heat shock protein との相同性が blast 検索により確認された。

今後の展望

今回の検索によってマラッセ上皮細胞に強く特異的に発現している遺伝子の存在を確認することができた。今後、さらにエナメル関連タンパクをはじめとしたセメント質形成誘導因子を検索していく。この中には、今までに報告されたもの以外に新たな遺伝子の含まれている可能性もある。またそれらの遺伝子の機能的検索によりセメント質の再生による歯周組織の再生のみならず骨の再生の促進、誘導に関わる新たな遺伝子など総合的に解析することにより、マラッセ上皮細胞本来の機能、役割についても検索していきたい。