

氏名	山本直史
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1858号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	歯根膜線維芽細胞が特徴的に発現する遺伝子に関する研究
論文審査委員	教授 滝川正春 教授 福井一博 教授 村山洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯根膜組織の役割は、主に歯根膜線維芽細胞(PDL)の機能から捉えられてきた。しかし、これまでの研究はPDLの機能を既知の細胞調節因子との関連について調べたものがほとんどであるため、PDLの特徴的な機能がすべて明確になったとは言い難い。PDLの機能を明らかにするためには、他組織の線維芽細胞に比較してPDLが特徴的に発現する遺伝子を同定することが必要である。本研究では、PDLが発現する遺伝子を同一個体の隣接組織である歯肉に由来する線維芽細胞のそれに比較した。すなわち本研究は、PDLが発現する遺伝子と歯肉線維芽細胞(GF)が発現する遺伝子の比較をサブトラクティブハイブリダイゼーション(SBH)を用いて行い、PDLが特徴的に発現する遺伝子を同定して、その遺伝子が関与する機能を考察するものである。

【材料および方法】

1. 線維芽細胞の調整とその培養：PDLおよびGFは、全身疾患がなく健康な歯周組織を有するヒトの、矯正治療のために便宜抜去した歯に付着する歯根膜および辺縁歯肉から各々分離し、Nishimuraらの方法(J Dent Res, 1996)に基づいて調整および培養した。
2. Complementary DNA (cDNA) の合成：両細胞を培養してコンフルエントの状態でもRNAを調製し、Gublerらの方法(Gene, 1983)に基づいて各々の2本鎖cDNAを合成した。
3. SBH法：EcoRIアダプターを付加したPDLのcDNAと、平滑末端で小断片化したGFのcDNAを1:50の割合に混合し、37°Cでハイブリダイゼーション反応を行った。この反応終了液に含まれるEcoRI末端を有するcDNAをEcoRI切断したZAP Express Vector (Stratagene)に挿入し、サブトラクティブcDNAライブラリーを作製した。
4. ディファレンシャルハイブリダイゼーション(DH)法：SBHで得たクローンのインサートDNAをナイロン膜上にドットプロットし、この膜にPDLおよびGF各々の混合cDNAから作製した³²P標識cDNAプローブをハイブリダイズさせ、PDLのcDNAプローブに強くハイブリダイズするクローンを選択した。
5. 部分塩基配列の決定および既知遺伝子との相同性の検索：上記クローンのインサートDNAの部分塩基配列を自動シーケンサーを用いて決定し、これをGenBankをはじめとする遺伝子データベースに照合して既知遺伝子との相同性を検索した。
6. ノーザンプロット法：PDLおよびGF各々のmRNAを調製後、ナイロン膜上に転写し、この膜に上記クローンのインサートDNAから作製した³²P標識cDNAプローブをハイブリダイズさせ、各プローブにハイブリダイズする両細胞のmRNAのサイズと発現量を調べた。

7. *In-situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法：スライドガラス上に 4%パラホルムアルデヒドで固定した密度の異なる PDL および GF に上記クローンのインサート DNA から作製した digoxigenin (DIG) 標識 RNA プローブをハイブリダイズさせ、明貝の方法 (岡山歯誌, 1993) に基づいて ISH を行った。

【結果および考察】

1. サブトラクティブ cDNA ライブラリーの組成

SBHによって 6.0×10^3 pfu のサブトラクティブ cDNA ライブラリーを作製した。このうちインサートを有するのは 400 クローンであった。

2. PDL が特徴的に発現する遺伝子のスクリーニング

400 クローンのなかから DH によって PDL の cDNA プローブに強くハイブリダイズする 34 クローンを選択した。

3. 部分塩基配列の決定および既知遺伝子との相同性の検索

34 クローン各々について部分塩基配列を決定した。これらのうち 30 クローンは既知のヒト cDNA に高い相同性を示した。これら遺伝子の半数は細胞の増殖および分化を制御する遺伝子であり、PDL の増殖および分化の一時期に発現すると考えられる。残りの 4 クローンはヒト cDNA に低い相同性を示した。

4. ヒト cDNA に低い相同性を示すクローンの性状

1) 各クローンの mRNA 発現の検出および発現量の解析

ノーザンプロットによって、4 クローン全ての mRNA をシングルバンドとして検出した。すなわち、これら 4 クローンは歯根膜線維芽細胞が発現する未知の cDNA である可能性がある。両細胞での各クローンの mRNA 発現量は、わずかしき差を示さなかった。

2) 全塩基配列の決定および相同性の検索

4 クローンのうち 2 クローン (PDL-48, 108) の全塩基配列を明らかにした。PDL-48 は核内蛋白の一種である *Mus musculus* の NUDC protein に高い相同性を示すことから、線維芽細胞の転写系を制御する遺伝子である可能性がある。PDL-108 は機能が不明な STS WI-13062 という cDNA に低い相同性を示すのみであった。

3) 培養細胞が発現する PDL-108 mRNA の検出

In-situ ハイブリダイゼーションによって PDL および GF の細胞密度にかかわらず PDL-108 mRNA を検出したことから、PDL-108 は線維芽細胞の増殖時に発現する遺伝子の一種の可能性がある。

5. ヒト cDNA に高い相同性を示すクローンの性状

1) 各クローンの mRNA 発現および発現量の解析

ノーザンプロットによって、30 クローンのうち 1 クローン (PDL-190) の遺伝子の転写産物と考えられるおよそ 2 kb の mRNA を PDL に強く検出した。PDL-190 mRNA のバンドの黒化度を β -アクトチンのバンドの黒化度に対する相対比で比較すると、PDL での発現は GF のその約 5 倍を示した。その他の 29 クローンの mRNA は、両細胞に同程度の発現であった。

2) PDL-190 の性状

PDL-190 の全塩基配列を決定した。PDL-190 はミトコンドリアの呼吸系に関与すると言われる cytochrome oxidase assembly factor (PET112) に部分的に高い相同性を示した。しかし、両遺伝子の全長同士を比較すると 79% の相同性に過ぎず、翻訳部位である読み枠 (ORF) のアミノ酸配列は 83% の相同性に過ぎなかったことから、構造は似ているものの別の遺伝子で、その関与する機能も異なる可能性がある。

【結論】

1. PDL は増殖および分化に関与する多くの遺伝子を GF に共通して有していた。
2. PDL が特徴的に発現する遺伝子を 1 つ得た。それは、既知の遺伝子とは異なるものであった。

論文審査結果の要旨

本研究は、歯根膜線維芽細胞が特徴的に発現する遺伝子を同定して、その遺伝子が関与する機能を考察したものである。

研究の流れの概略は次の通りである：

- 1) 歯根膜線維芽細胞が発現する遺伝子と歯肉線維芽細胞が発現する遺伝子との比較をサブトラクティブハイブリダイゼーション法を用いて行った。
- 2) 1)によって得た遺伝子の部分塩基配列に相同性を示す既知の遺伝子を検索した。
- 3) 1)によって得た遺伝子の mRNA 発現を歯根膜線維芽細胞および歯肉線維芽細胞で調べて、歯根膜線維芽細胞が特徴的に発現する遺伝子を同定した。

論文には次の知見が記されている：

- 1) 歯根膜線維芽細胞は、増殖および分化に関与する多くの遺伝子を歯肉線維芽細胞と共有する。
- 2) 歯根膜線維芽細胞は、歯肉線維芽細胞でほとんど発現のない特徴的な遺伝子を 1 つ発現する。それは、既知の遺伝子とは異なる可能性がある。

これらの知見は、歯根膜線維芽細胞が歯肉線維芽細胞と同様に増殖および分化する一方で、特徴的な機能を発現する可能性を示唆するものである。また、その機能は本研究で得た歯根膜線維芽細胞に特徴的な遺伝子によって制御されている可能性があり、本研究内容は価値のある業績である。

したがって、本申請論文は学位論文に値するものと認める。