

エナメルタンパク質 —アメロゲニンとエナメルリンの生化学—

原田 実

松本歯科大学 口腔生化学教室 (主任 原田 実 教授)

Enamel Proteins —Biochemistry of amelogenin(s) and enamelin(s)—

MINORU HARADA

*Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. M. Harada)*

Summary

During the process of enamel formation by ameloblasts the extracellular matrix that is secreted first is relatively high in protein (20%), but, this percentage decreases during the maturation phase to less than 1%. Enamel proteins may be divided into two classes designated amelogenins and enamelins based upon their solubility, affinity to hydroxyapatite, amino acid compositions, and apparent molecular weight. Neutral salt or guanidine-HCl soluble amelogenins gradually hydrolyzes into small peptides during hydroxyapatite crystal formation, while enamelins, which solubilize after EDTA decalcification, remain in apatite crystal after maturation.

In this paper, biochemical studies on the amelogenins and the enamelins are described. This includes extraction from tissue preparation, purification procedure, primary and secondary structures of amelogenin, antibody production and their cross reactivity, amelogenin cDNA cloning and analysis of its nucleotides sequence, and the function of both proteins on crystal formation.

はじめに

萌出歯のエナメル質に存在するタンパク質の研究はすでに1942年 Deakins¹⁾によりはじめられていたが、エナメル質のタンパク質量は極めて少なく、純粋な試料を得ることが困難であった。しか

し、エナメル質形成中の未萌出歯ではタンパク質の存在が15~20%と多量存在するため、研究者の注目をあつめ、1960年にはエナメルタンパク質の研究が本格的になった。これらはタンパク質の研究の第一段階である、そのアミノ酸組成の分析に、重点がおかれたものであった²⁻⁵⁾。

これらの結果からエナメル質に存在するタンパク質はヒト、ウシ、ブタなど各種動物で、アミノ

酸組成が、すでに知られているコラーゲンやケラチンなどと相違するタンパク質であることがわかり、エナメル質に特有なタンパク質を“アメロゲニン(amelogenines)”と命名することを提案したのは Eastoe⁹⁾であった。また実際に、この名称をエナメルタンパク質に関する論文に使用したのは Eggert ら⁷⁾がはじめてであった。

一方、“エナメルイン(enamelins)”という名称は Mechanic⁸⁾がウシ胎児のエナメルタンパク質に用いたのが最初であった。しかしエナメル質から得たタンパク質に二種の名称が使用される混同をさけるため、エナメルインは成熟エナメル質のタンパク質に限定することが推奨された⁹⁾。

この様な経過からアメロゲニンとエナメルインは区別して使用されることになったが、化学的性質の相異に基づいて両者を区別して使用したのは Termine ら¹⁰⁾である。幼若エナメル質中のタンパク質を、EDTA 脱灰操作前後で両者を区別した。すなわち、EDTA 脱灰前に塩酸グアニジンで溶出されるタンパク質をアメロゲニン、脱灰後同一溶媒で溶出されるタンパク質分画をエナメルインと称した。

エナメル質に関する国際シンポジウムの Proceedings もすでに第4巻¹¹⁾が出版され、国内においても、昨年エナメル質に関する成書¹²⁾が出版されている。このように多くの報告から、生体で最も硬度の高いエナメル質の結晶形成に、エナメル芽細胞が合成・分泌するエナメルタンパク質がいかにかわりあっているかを理解するため、エナメルタンパク質の生化学的特徴を中心に本文をまとめた。

試料調製法

1. エナメル質試料の調製法とタンパク質含量

エナメルタンパク質を抽出精製するにあたって、幼若エナメル質試料が必要になる。分離部位やタンパク質収量が明示されている報告を記載した。

Termine ら¹⁰⁾は発育月数の異なるウシ胎児から未萌出臼歯歯胚を切開し、軟組織を機械的に除去後、歯を取出し、各種タンパク分解酵素阻害剤を含有する冷却(4℃)水溶液(0.05 M NaCl, 0.05 M ベンザミジン HCl, 0.01 M フェニルメタン スルホニルフルオリド, pH 7.2)に浸す。水溶

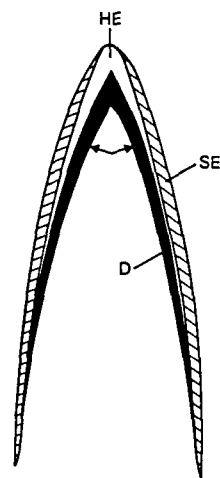


図1：ウシ胎児(4-5ヶ月)臼歯尖端部の切片模式図¹⁰⁾

The cross-hatched areas (SE) represent soft, scrapable enamel, the gray areas represent mineralized dentin (D), while the plain white areas represent more fully mineralized, hardened enamel (HE). After removal of the soft enamel layer, cuts were made at the arrows separating the remaining tissue into lateral dentinal remnants and cusp tips.

液を数回交換しながら超音波処理し、細胞成分を除去した。このように処理した幼若な歯は液体窒素で凍結し、-75℃に保存した。

この試料を水上で融解し、歯料用エキスカバーターを使用し、(a)軟エナメル質(SE)、(b)薄い硬エナメル質を含む象牙質層(D)、と(c)硬エナメル質(HF)と石灰化象牙質を含有する三層をそれぞれ分離採取し、-75℃に保存した(図1)。各層の剝離は形態学的に、またX線マイクロラジオグラフで検索し、軟エナメル質試料中に象牙質の混入がないことを確認している。表1に総タンパク質量(%) / 凍結試料湿重量、アパタイト量(%) / 凍結試料湿重量、アメロゲニン量、エナメルイン量がウシ胎児の発育月数と比較されている。

清水¹³⁾は生後約6ヶ月のブタの新鮮な下顎骨から前歯、臼歯の歯胚を取り出し、軟組織と歯髓を除去後、図2に示す部位の石灰化の程度の異なる4種類の幼若エナメル質を得ている。チーズ状のエナメル質の表層部はつくられて間もないエナメル質であり、ついでチーズ状エナメル質、チーズ状とチョコレート状の移行部のエナメル質、チョコク

表1：ウシ未萌出白歯エナメル質のアメロゲン（溶出1）とエナメルリン（溶出2）が胎児（発育月数）に存在する量¹⁰⁾

Fetal age	Tissue examined	% Apatite mineral/ tissue frozen wet weight	% Total protein/ tissue frozen wet weight	Fraction of total matrix protein present as			
				Amelogenin		Enamelin	
months				% total tissue protein	μg/average molar cusp	% total tissue protein	μg/average molar cusp
2-4	Soft scrapings	60-65	10-12	65-70	105	30-35	45
5-6	Soft scrapings	70-75	8-10	85-90	400	10-15	65
7-8	Soft scrapings	80-85	4-6	65-70	325	30-35	105
5-6	Hardened cusp enamel ^a	~90	1-2	~50	60	~50	60

^aExtract 2 proteins from hardened cusp tips were composites of enamelin and dentin proteins. The proportions of enamelin in these preparations were estimated from amino acid analytical and electrophoretic/chromatographic data.

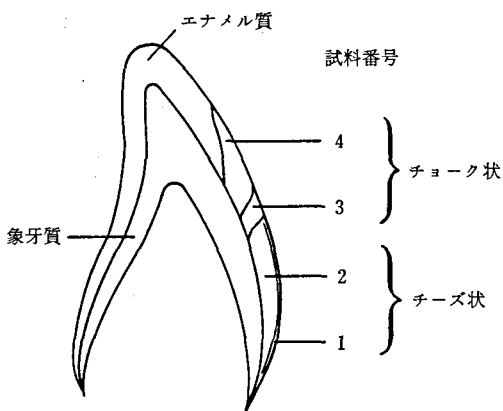


図2：幼若エナメル質の試料採取部位¹³⁾

状のエナメル質と、石灰化の程度が増加すると報告している。表2に含水量とタンパク質含量を示した。

2. アメロゲンとエナメルリンの溶出法

エナメルタンパク質の可溶化条件は研究者によりそれぞれ異なっている。大別すると、1) 水、塩化ナトリウム溶液可溶性⁹⁾、中性可溶性として0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)^{14,15)}、0.02-0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)^{13,16)}、4.0 M 塩酸グアニジン-0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)¹⁷⁾などで可溶化するもの、2) EDTA を使用し中性で脱灰可溶化する方法^{5,10,13-15,17)}や、アルカリ性で処理⁷⁾している場合、3) 酢酸酸性で脱灰可溶化する方法^{7,13-15,17-19)}がある。Fincham

表2：ウシとブタの幼若エナメル質の含水量とタンパク含量。試料番号は図2参照¹³⁾

試料番号	ウシ		ブタ	
	水	タンパク	水	タンパク
1	38.2±2.1	29.7±1.8	37.1	29.6
2	32.9±1.0	17.4±0.8	35.1	18.8
3	35.6±0.4	9.3±1.0	36.0±0.8	8.3±1.25
4	28.6±0.8	1.8±0.6	26.3±1.1	1.1±0.43

湿性重量当たりの%

ら¹⁸⁾は酢酸(10% v/v)のみによる抽出を行なったがそのほかは2あるいは3種の可溶化方法を組合せて使用した。また、タンパク質の加水分解を阻害し、分解修飾を受けない生来のタンパク質を分離するため、各種タンパク分解酵素やリン酸の加水分解酵素の阻害剤を添加した0.5 M EDTA (pH 8.3)で脱灰可溶化し、不溶性残渣をさらに、0.05 M 重炭酸アンモニウムで溶出する方法²⁰⁾。さらに、セシウムクロライド溶液 (d=1.9, 25°C) あるいは、セシウムホルメート溶液 (d=2.3, 35°C) を使用し、密度の相違で分画後、溶出する方法²¹⁾がある。

アメロゲンとエナメルリンを最初から分画溶出する方法として Termine ら¹⁰⁾は採取した軟エナメル質 5 g の凍結材料に対し、1000 ml の溶媒 (4.0 M 塩酸グアニジン, 0.05 M トリス, 0.1 M 6-アミノヘキサノイン酸, 0.005 M ベンザアミジン Cl, 0.001 M フェニルメタンスルホニルフルオリド, pH 7.4) 4°C で72時間一定速度で攪拌

して溶出を行なった(溶出液1), その後3000回転で遠心沈殿し, 残渣は次の溶出に使用した。第2の溶出は1回目と同様に行っているが, 組成としてさらに0.5 M EDTA-4 Naで72時間, 4℃1000 mlで溶出した(溶出液2)。

溶出液1はウルトラフィルトレーション(AmiconPM-10フィルター)で濃縮後, 透析チューブ(Mr=6000-8000cut off)を使用, 4℃で水に対して十分透析し, 凍結乾燥した。溶出液2も1同様に処理した。この方法で溶媒は塩酸グアニジンであり, EDTA脱灰前後でアメロゲニンとエナメリンを分画したことになる。

3. エナメルタンパク質の分画精製法

アメロゲニンの精製はウシ永久切歯歯胚のチーズ状エナメル質から行われた。0.5 N 酢酸で脱灰溶出, 透析後, 凍結乾燥したタンパク質をSephacryl S-200カラムクロマト, 等速度電気泳動法で精製し, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動的に均一な試料を得た²³⁾。

一方, エナメリンについては未萌出ブタ下顎臼歯の幼若エナメル質を剝離し, 材料とした。10% (v/v) 酢酸で6日間, 4℃で脱灰, 透析処理(12,000 Da以下透析), さらに1%酢酸で透析後, 不溶性成分を除去した後, 精製を行なった。Bio-Gel-P 100クロマト操作(0.1 M ギ酸), polyanion調製用カラム(0.05 M トリス-HCl 緩衝液 pH 7.4, 7 M-尿素を含有する)でクロマトを2回行ない, ポリアクリルアミド電気泳動的に均一なバンド(銀染色)を得た¹⁷⁾。

アメロゲニンとエナメリンの生化学的性質

1. 構成アミノ酸と糖組成

エナメルタンパク質がケラチンやコラーゲンと相違する特異なタンパク質であることはアミノ酸組成の分析結果から証明されたが, エナメルタンパク質は不均一性を示し, エナメル質形成過程における相違, 動物種による相違などにより分析値は各研究者で必ずしも一致していない。

Takagiら²³⁾はウシ切歯歯胚からアメロゲニンを精製し, 一次構造を明らかにした。構成アミノ酸は170残基で分子量19,350であった。アミノ酸組成を1,000残基に換算し表3に示した。この結果と比較のため, ヒト¹⁸⁾, ブタ¹⁶⁾, ウシ¹⁰⁾の分析結果をあげた。一方, エナメリンについての報告は少な

く, 一次構造はまだ決定されていない。アメロゲニンと比較のため, Termineらの結果¹⁰⁾と, ハムスターについての分析値²⁴⁾を記載した。一般にアメロゲニンはプロリン, グルタミン酸(グルタミンとして存在), ロイシン, ヒスチジンなどが多く疎水性であるのに対し, エナメリンはプロリン, グルタミン酸, アスパラギン酸, グリシンが多く, シアル酸(3~5%)を含有する糖タンパク質(糖組成約15%)であることが受け入れられている。ただし, エナメリンについてはセリン, プロリンの値は報告によって相違がある。

2. 分子量ならびに不均一性

ウシ幼若エナメル質から4 M 塩酸グアニジンで溶出されるタンパク質分画, アメロゲニン(第1画分)を除いた後に0.5 M EDTAを含有する同一溶媒で溶出されるタンパク質分画(第2画分)の両者をSDS-ゲル電気泳動(7.5%トリス/グリシン/尿素)し, 泳動パターンを分子量マーカーと比較すると, EDTA脱灰によって得られたタンパク質分画のパターンは未脱灰溶出タンパク質より分子量が大きい位置に泳動されている。両者のアミノ酸組成の分析結果, SDS-電気泳動パターン, アバタイトとの吸着実験, EDTA-脱灰で得られるタンパク質の抗体との反応性などからTermineら¹⁰⁾は前者をアメロゲニン, 後者をエナメリンと同定した。

アメロゲニン分画はSephacryl S-200でゲル透過を行ない, ウシ胎児の発育月数(2-4, 5-6, 7-8ヶ月)によるクロマトパターンを比較した結果, 主ピークは~25,000, 15,000, 9,500, 7,500, 6,000などあり, しかも月数が進むにつれ, 高分子量のピークは低分子量のピークへ置換する様子がクロマト上で見られた。一方, エナメリン分画はFergusonプロット(ゲル濃度T%に対するlog Rf値)や, Sephacryl S-200のクロマトパターンから~72,000, 56,000, 42,000の高分子量のものと同定した。発育にともなう分子量の低下はエナメリンでも観察された¹⁰⁾。

ウシアメロゲニンの分子量については, 先にアミノ酸組成のところで述べたように, 19,350と報告²³⁾されたが, ブタのアメロゲニンについても26,000と21,000の2種が同定され, 前者から後者への変化がC-末端側の切断で生じたことが証明

された¹⁶⁾。また、ヒトのアメロゲニンに関する報告では主ピークとして25,000~23,000の分子量のタンパク質を同定¹⁸⁾している。

エナメリンの分子量はヒトの材料¹⁸⁾で70,000、ブタの材料¹⁶⁾で67,000と63,000をそれぞれゲル濾過法によるクロマト上で同定している。ブタから精製したエナメリンは50 mM 酢酸緩衝液, pH 6.0, 37°Cで48-72時間処理し, 60°Cに加熱反応停止後, ポリアクリルアミドスラブゲルで電気泳動すると, 63,000のバンドが完全に消失していることがわかった。これは加水分解酵素がエナメル質からの溶出操作の段階で除去されていないか, エナメルタンパク質が自己消化能を示すと考えられる。分子量63,000のエナメリンは分解され易く, アバタイトを反応系に添加しても分解は抑制不可

能であった。一方, 分子量67,000のエナメリンは分解に対し抵抗性を示すことは成熟エナメル質中にエナメリンが残存することと関連すると述べている。さらに, アメロゲニンは分解され安くエナメリンは抵抗性を示す報告²⁵⁾がある。

このように, アメロゲニンやエナメリンが不均一性を示すのは加水分解が生じるため, 加水分解酵素の部分精製と性質¹³⁾, タンパク分解酵素の組織化学的検索²⁶⁾が行われている。強い反応がエナメル基質とエナメル象牙境に沿う象牙質の幅狭い層に観察されている。

3. 一次構造と二次構造

アメロゲニンの一次構造に関する報告は Fukaeら¹⁶⁾によりN-末端より54残基が決定され, 次いでウシ, ブタ, アメロゲニンについて,

表3: エナメルタンパク質のアミノ酸、糖質組成

分子量	アメロゲニン				エナメリン			
	ウシ* 19,350	ウシ 19,350	ヒト 25,000	ブタ 25,000~ 26,100	ウシ 21,000~ 28,000	ウシ 42,000~ 72,000	ハムスター 160,000~ 200,000	ブタ 67,000
アスパラギン酸	1	} 23.5	} 23	} 35.3	} 35	} 115	} 73	} 99
アスパラギン	3							
スレオニン	3	17.6	34	38.3	33	67	40	54
セリン	5	29.4	32	41.6	34	77	198	55
グルタミン酸	0	} 182.4	} 167	} 175.5	} 235	} 150	} 157	} 177
グルタミン	31							
プロリン	49	288.2	298	237.8	304	166	36	83
グリシン	6	35.3	42	40.3	23	112	211	75
アラニン	4	23.5	18	28.3	41	56	94	87
システイン	0	0	—	—	—	—	—	tr
バリン	8	47.1	46	32.3	41	33	33	17
メチオニン	8	47.1	48	60.9	—	—	6	tr
イソロイシン	8	47.1	35	36.4	34	21	20	35
ロイシン	18	105.9	85	96.5	110	23	32	95
チロシン	6	35.3	45	34.7	6	32	15	7
フェニルアラニン	3	17.6	14	16.0	18	55	15	57
リシン	1	5.9	9	26.3	7	32	23	85
ヒスチジン	12	70.6	91	87.3	76	25	37	32
アルギニン	1	5.9	11	11.5	4	36	11	42
トリプトファン	3	17.6	—	—	—	—	—	—
リン酸					tr	0.22		
シアル酸					0.90	4.71		
ガラクトサミン					0.17	1.08		
グルコサミン					0.14	3.24		
総糖質含量(アンソロン法)					8.2	15.2		

文献番号 23) 18) 16) 10) 10) 24) 17)

アミノ酸組成: 残基数/1,000残基, 但し*印は残基数/1分子 Mr=19,350

その他の組成: パーセント/タンパク重量

tr: 微量存在, —: 測定値なし

アミノ末端からの分析が行われた結果、動物種や分子の大きさにかかわらず、アミノ末端から27残基のアミノ酸配列は共通性が認められた²²⁾。

完全な一次構造の決定は Takagi ら²³⁾により報告された。ウシ幼若切歯エナメル質の精製アメロゲンをクロストリパン、キモトリプシン、トリプシン、カルボキシペプチターゼ Y による酵素処

理と、CNBr による限定分解を組合せてペプチドを分離精製後、Edman 法でアミノ酸配列を決定した(図3)。この構造は今日までに報告された分シタンパク質と相同性はなく、全く新しいものであった。

アメロゲニンの二次構造については固体と溶液状態でそれぞれ、cross β -構造、 β -構造を示す

	1	5	10	15	20	25
Bovine	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asn-Phe-Ser-Tyr-Gln-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Trp-					
Comp-8	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asn-Phe-Ser-Tyr-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Trp-					
Pig-G	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asn-Phe-Ser-Tyr-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Trp-					
Human-I	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asn-Phe-Ser-Tyr-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Trp-					
Human-J	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-Xaa-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asn-Phe-Ser-Tyr-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Trp-					
Pig	Met-Pro-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Tyr-Ile-Asp-Phe-Ser-Tyr-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Leu-Lys-Xaa-					
	26	30	35	40	45	50
Bovine	Tyr-Gln-Ser-Met-Ile-Arg-His-Pro-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Gln-Pro-Met-Gly-Gly-Trp-Leu-His-His-Gln-Ile-					
Comp-8	Tyr-Gln-Ser-Met-Ile-Arg-His-Pro-Tyr-Ser-Pro-Tyr-Gly-Tyr-Glu-Pro-Met-Gly-Gly-Trp-Leu-Trp-Gln-Gln-Ile-					
Pig-G	Tyr-Gln-Asn-Met-Ile-Arg-His-Pro-Tyr-Xaa-Xaa-Tyr-Gly-Tyr-Glu-Pro-					
Human-I	Tyr-Gln-Ser-Ile-Xaa-Pro-Pro-Tyr-....					
Human-J	Tyr-Gln-Ser-Ile-Met-....					
Pig	Tyr-Glu-Asp-Met-Ile-Xaa-His-Pro-Tyr-Thr-Ser-Tyr-Gly-Thr-Glu-Pro-Met-Gly-Gly-Xaa-Leu-His-His-Glu-Ile-					
	51	55	60	65	70	75
Bovine	Ile-Pro-Val-Val-Ser Gln-Gln-Thr-Pro-Gln-Asp-His-Ala-Leu-Gln-Pro-Pro-His-His-Ile-Pro-Met-Val-Pro-Ala-					
Comp-8	Ile-Pro-Val-....					
Pig	Ile-Pro-Val-Val-....					
	76	80	85	90	95	100
Bovine	Gln-Gln-Pro-Val-Val-Pro-Gln-Gln-Pro-Met-Met-Pro-Val-Pro-Gly-Gln-His-Gln-Pro-Asn-Leu-Pro-Leu-Pro-Ala-					
	101	105	110	115	120	125
Bovine	Gln-Thr-Pro-Phe-Gln-Pro-Gln-Ser-Ile-Gln-Pro-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Gln-Pro-					
	126	130	135	140	145	150
Bovine	Met-Gln-Pro-Leu-Gln-Pro-Leu-Gln-Pro-Leu-Gln-Pro-Leu-His-Pro-Pro-Gln-Pro-Ile-Val-Gln-Pro-Ile-Pro-Phe-					
	151	155	160	165	170	
Bovine	Pro-Pro-Leu-Pro-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Met-Leu-Pro-Asn-Leu-Pro-Leu-Gln-Ala-Trp					

図3：各種動物アメロゲニンの一次構造の比較

- Bovine : ウシ, アメロゲニン一次構造, 分子量19,350, Ser(16)はリン酸化²³⁾
 Comp-8 : ウシ, 53残基のアミノ末端部分構造, 分子量27,000²²⁾
 Pig-G : ブタ, 41残基のアミノ酸配列 分子量5,000²²⁾
 Human I : ヒト, 33残基のアミノ酸配列 分子量5,000²²⁾
 Human J : ヒト, 30残基のアミノ酸配列 分子量5,000²²⁾
 Pig : ブタ, 54残基のアミノ末端部分構造, 分子量26,100¹⁵⁾
 アミノ末端より27残基は動物間で均一性がある。

ことが報告²⁷⁾されたが、さらに一次構造の結果を取り入れた報告が提出された。すなわち、Renugopalakrishnan²⁸⁾らは円偏光二色性(CD)とフーリエ変換赤外分光分析法(FT-IR)を応用し、すでに述べた Strawich らの方法²⁰⁾で調製した精製ウシアメロゲンについて分析した。CD スペクトルの解析は pH 7.2 と 1.6 で測定し、負の極大(208 nm)、正の極大(196 nm)における分子楕円率 θ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) を Chang ら²⁹⁾の提出した数式に準じてコンピューター処理し、二次構造を求めた。結果は pH 7.2 では α -ヘリックス 16%、 β -シート 30%、 β -ターン 21%、ランダム 33%であるのに対し、pH 1.6 では正の極大は得られず、負の極大(203 nm)のみが測定され、 θ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) 値より、 α -ヘリックス 0%、 β -シート 58%、 β -ターン 3.5%、ランダム 38.5%であった。Ca²⁺の反応液への添加を同様に測定した結果、4 μM では二次構造に変化は起っていないが、8、16 μM の添加で変化が生じ、16 μM の Ca²⁺が存在すると α -ヘリックス 6.5%、 β -ターン 8.5%、ランダム 24%と低下するのに対し、 β -シートが 61%と増加した。

FT-IR 測定はアメロゲン水溶液、pH 1.8 と 2.25 (KCl-HCl 緩衝液) 4.8 (酢酸緩衝液) と 5.86 (ピペリジン緩衝液)、8.17 (NH₄HCO₃ 緩衝液) と 9.23 (トリス緩衝液) で、それぞれ、アミド I 振動、アミド II 振動、アミド III 振動の変動が測定された。pH 5.86 におけるアミド I 振動は 1667 cm^{-1} と 1632 cm^{-1} に、アミド II 振動は 1580 cm^{-1} 、1551 cm^{-1} 、1524 cm^{-1} に、アミド III の振動は 1281 cm^{-1} と 1250 cm^{-1} にそれぞれ吸収帯を示した。このようにして得られた測定値をそれぞれ二次構造の反復 β -ターン、 β -シート構造、 β -ターン構造に帰属させ、さらに一次構造を考慮し、定性的な試案として、ウシアメロゲンの二次構造を提出した。(図 4) さらに同じ研究グループがラマン散乱分析による二次構造の分析について報告³⁰⁾している。しかし、エナメルンに関してまだ報告はない。

4. アメロゲンとエナメルンの抗体産生と抗原決定基

溶解度、アミノ酸組成、分子量など化学的性質の相違によりアメロゲンとエナメルンは性質の異なるタンパク質であることは理解できるが、同

じエナメル芽細胞が二種のタンパク質を生合成するのか、一種のタンパク質が生合成され、細胞から分泌された後の修飾によって、性質に相違が現われるのか疑問である。この点を解決する方法の一つとして、極めて特異性の高い抗原-抗体反応を利用する免疫化学的方法がある。

エナメルタンパク質のポリクロナール抗体作成は各種動物で 1971 年頃から進められてきたが、モノクロナール抗体の作成は Christner ら³¹⁾によりはじめて報告された。3-6 ヶ月のウシ胎児のエナメルタンパク質を採取し、keyhole limpet haemocyanin と結合させた後、Balb/c (♀) 6 週マウスに免疫し、血清中の抗体産生を ELISA 法で検索すると共に、脾臓細胞を Myeloma cell line Sp 2/0-Ag14 と 5:1 の割合で混合、50% ポリエチレングリコール中で細胞融合させた。細胞は 92-ウエルの組織培養プレートで培養し、クローンの抗体産生を ELISA で検出した結果、エナメルタンパク質に対する二種のモノクロナール抗体の産生が証明された。ウシ胎児臼歯切片をモノクロナール抗体で処理し、間接酵素抗体法によって染色すると、エナメル基質層が強染され、その他、エナメル芽細胞に含有される顆粒が陽性を示す以外、エナメル器中間層、星状網には反応はまったく陰性であった。この抗体作成法を応用し、アメロゲンとエナメルンにそれぞれ特異なモノクロナール抗体の作成に成功した³²⁾。アメロゲンを認識するモノクロナール抗体は 6 種生成されたが拮抗法にもとづく ELISA 検索で、この 6 種の抗体は 3 種にグループ分けが可能であり、アメロゲンの抗原決定基の相互関係のモデルを示した。また、アメロゲンを SDS スラブ電気泳動後、イムノブロット法で染色すると、分子量 16,000、24,000、28,000、30,000 の染色バンド以外に 45,000、60,000 の位置に染色バンドが検出され、分子量の大きいアメロゲンの存在が示唆された。一方、エナメルンに対する抗体産生クローンは一種であった³³⁾。産生抗体はエナメルンにのみ特異的に反応し、組織化学的検索の結果もエナメル質にのみ特異的な反応を示した。以上の結果はアメロゲンとエナメルンは共通の抗原決定基を保有しないわけ、それぞれ異なる性質のタンパク質であることが示唆された。

ヒトのエナメルン(分子量 70,000)に対するポ

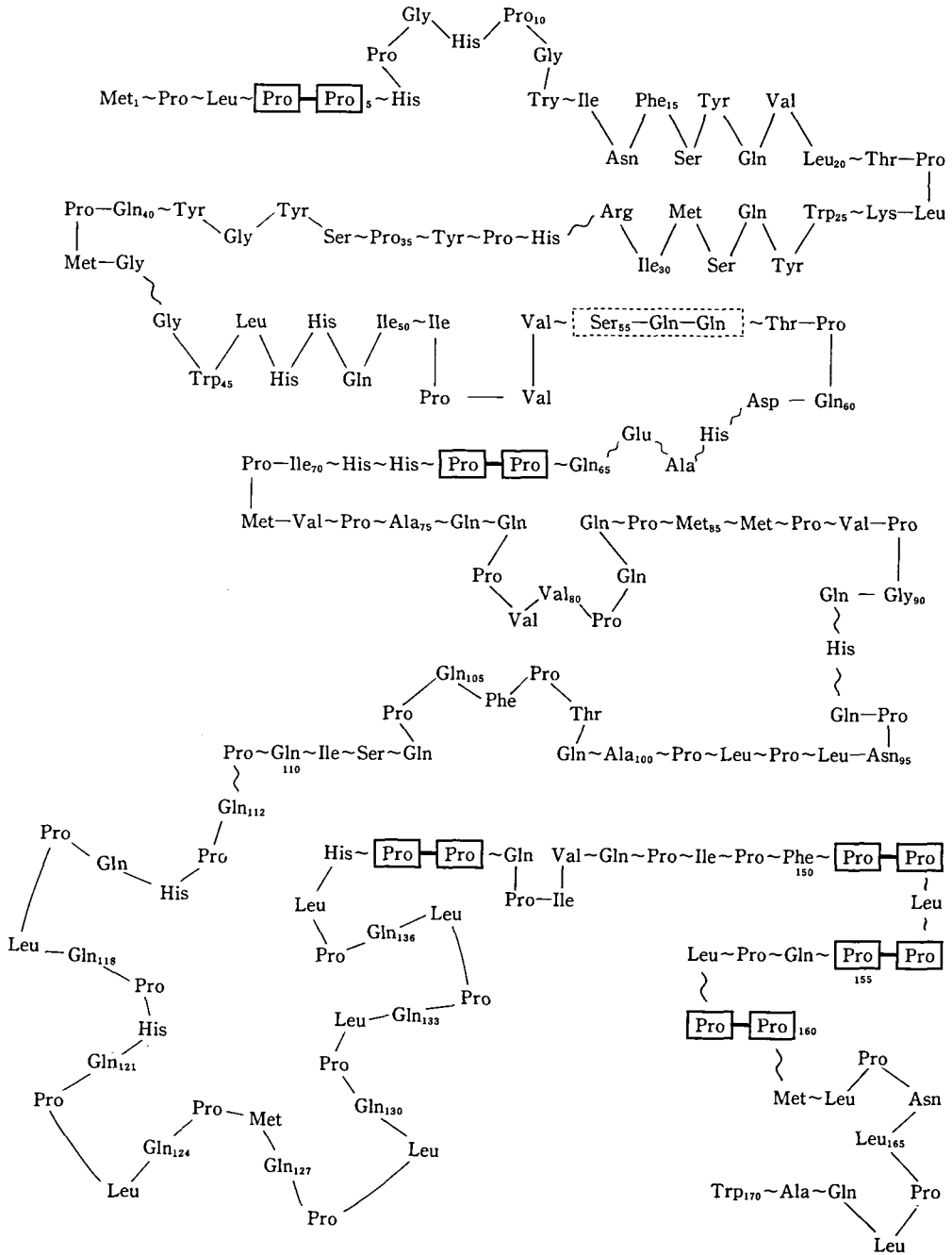


図4：Renugopalakrishnanらによって提出されたアモロゲニンの推定二次構造²⁹⁾

Predicted secondary structure of dephosphorylated bovine amelogenin from the primary structure reported by Takagi et al. (1984), using the Chou-Fasman algorithm. (λ), (\square), and ($\sim \cdot \sim$) represent β -sheet, β -turn, and "unordered" structures. Ser (P) occurs at position 16. Polyproline-type structures occurring in Pro-Pro segments are shown boxed in boldface. A trans-trans conformation for peptide bonds was tacitly assumed in the predicted secondary structure.

リクロナール抗体をはじめで作成し、エナメルタンパク質の免疫化学的性質を検索した報告¹⁹⁾ではアメロゲニンに相当する分子量28,000, 24,000, 20,000のタンパク質とも弱い交差反応性を示すため、両者が共通抗原決定基を保持しているものと推論している。また、マウスアメロゲニンの抗体はヒトのアメロゲニンとは交差性を示すが、エナメルリンとは交差性を持たないことをスラブゲル電気泳動—Western-blot法で示した。

抗原決定基の問題はLauら²⁴⁾の報告がある。すでにマウスアメロゲニンのcDNAのクローニングとDNAの塩基配列を報告³⁵⁾したが、アメロゲニン遺伝子のcDNAライブラリーをポリクロナール抗体、あるいは核酸プローブでスクリーニングした後、cDNAによって発現された抗原決定基に特異的な検体のサブセットをポリクローン抗アメロゲニン抗体から、クロナールエピトープ選択法で同定した。この結果アメロゲニンのC-末端からアミノ酸残基79をコードするクローン中に抗原決定基を同定した。

5. アメロゲニンの定量法

抗ウシアメロゲニン—ウサギ抗体とアルカリホスファターゼを標識した抗ウサギIgGヒツジ抗体を使用したELISA法で5—500 μg アメロゲニンの定量法を確立した³⁶⁾。

エナメルタンパク質の生合成と遺伝子解析

1. エナメルタンパク質の生合成と分泌

器官培養系、あるいはin vivoにおける動物実験系で、放射性同位元素を使用し、アメロゲニン、エナメルリンへの取り込み実験により、エナメルタンパク質の経時的な変動についての報告³⁷⁾がある。生後3日のゴールデンハムスターの臼歯歯胚培養系で^[³⁵S]—メチオニンをトレーサーとしてパルス—チェイス実験し、放射活性のとり込みを光学的にオートラジオグラフィや、抽出後のタンパク質画分をSDS/尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動し、そのフルオログラフからタンパク質の動態を観察した結果、各15, 60, 90, 360分のパルス後30分チェイスした時、アメロゲニンは60分で細胞外基質分画に存在しているのに対し、エナメルリンは殆んどエナメル芽細胞を含むエナメル器に存在した。6時間の場合アメロゲニン分子は低分子化するが、エナメルリン分画の比活性

はさらに高くなっている。

StrawichとGlimcher³⁸⁾はラットを使用し、^[³H]—セリンと^[³H]—プロリンのエナメル器細胞と細胞外基質へのとり込みの経時的変化を NH_4HCO_3 可溶タンパク画分の電気泳動によって検索した結果、分子量25,000のタンパク質が最初に細胞外に分泌されることを報告した。ShimokawaとSasaki³⁹⁾も同様の特告を行なっている。またBronckersとWöltgene⁴⁰⁾はハムスター臼歯歯胚の培養系で、^[³H]—チミジンによる細胞増殖、^[³H]—プロリンによる基質タンパク質の生合成、⁴⁵Caと³²PO₄による石灰化と弗素イオン(F⁻)濃度との関連性を細胞レベルにおいても検索した。F⁻濃度が1.31 mM以上では細胞増殖、アメロゲニンの生合成は抑制されている。F⁻が低濃度である52 μM で⁴⁵Caや³²PO₄のとり込みは増加しており、アメロゲニンの生合成はF⁻の無添加の場合と同様に行なわれているが、低濃度ではタンパク質の分泌を妨害している可能性を示唆した。

2. cDNAのクローニングと塩基配列の決定

Sneadら⁴¹⁾は生後2日のマウス(Swiss—Webster)のエナメル器からmRNAを抽出し、無細胞系におけるエナメルリン(Mr:62,000)とアメロゲニン(Mr:28,000, 26,000, 22,000)の合成をゲル電気泳動(NaDod SO₄/ポリアクリルアミド)上、^[³²S]—メチオニンの放射活性に基づくフルオログラフィーとマウスアメロゲニンのポリクロナール抗体で同定した。そこで、ポリ(A)⁺—RNAを鋳型とし逆転写酵素によりcDNAを合成、プラスミドベクターpBR322のPst Iサイトに挿入した。転換体は^[³²P]cDNAプローブでスクリーニングした。アメロゲニンDNAの塩基配列陽性のコロニーは13%であった。プラスミドからハイブリッド選択によって得たRNAは無細胞系で翻訳し、さらにマウスアメロゲニンのポリクロナール抗体で確認しpMa5/5クローンがアメロゲニンmRNAを選択していることを確認した。またこのpMa5/5をニックトランスレーションし、Southern blot法によりマウスとヒトの染色体DNA中にアメロゲニンDNAの存在を決定した。ついで、pMa5/5のDNA塩基配列を決定するため1本鎖DNAファージ—M13にcDNAを組み込み、大腸菌に感染させ、大量の1本鎖DNAを調製した。配列決定はSangerのジデオキシ法でおこ

なった³⁵⁾。決定されたアメロゲニン cDNA クローン、pMa5/5の塩基配列は図5に示した。

塩基配列は停止コドンを有し、3'末端側は完全であったが、5'末端側に81塩基が欠如していることが、アミノ末端アミノ酸配列の分析から明らかになされているため、完全なマウスアメロゲニンの構成アミノ酸は180残基で、分子量は23,532Daと算出された。

Shimokawaら⁴²⁾は18ヶ月の子牛(雄)の未萌出切歯の精製アメロゲニンとエナメル芽細胞層の組織から抽出したRNAを用い、分子量が約27,000

のアメロゲニンのアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を決定した。発現ベクターとしてλgt11を使用し、3,500個の組換えλgt11ファージからアメロゲニンを合成しているブラークを20種得た。このうち2種のクローンλAm16とλAm11のcDNAをEcoRIで切断しM13mp19に、PstIあるいはHind IIIで処理してM13mp18の適当なクローニング部位に組み込んだ。JM101細胞をこれらで形質転換し、1本鎖DNAを17bpのプライマーとアニーリングし、Sangerらのジデオキシ法によりアメロゲニンの

```

CTG CAG GGG GGG GGG GGC CAG AGC ATG ATA AGG CAG CCG TAT
GLN SER MET ILE ARG GLN PRO TYR

CCT TCC TAT GGT TAC GAA CCC ATG GGT GGA TGG CTG CAC CAC CAA
PRO SER TYR GLY TYR GLU PRO MET GLY GLY TRP LEU HIS HIS GLN

ATC ATC CCT GTG CTG TCT CAA CAG CAT CCC CCG AGT CAC ACC CTT
ILE ILE PRO VAL LEU SER GLN GLN HIS PRO PRO SER HIS THR LEU

CAG CCT CAT CAC CAC CTT CCC GTG GTG CCA GCT CAA CAG CCC GTG
GLN PRO HIS HIS HIS LEU PRO VAL VAL PRO ALA GLN GLN PRO VAL

GCC GCC CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT CCT GGC CAC CAC TCC ATG
ALA PRO GLN GLN PRO MET MET PRO VAL PRO GLY HIS HIS SER MET

ACT CCA ACC CAA CAC CAT CAG CCA AAC ATC CCT CCA TCC GCC CAG
THR PRO THR GLN HIS HIS GLN PRO ASN ILE PRO PRO SER ALA GLN

CAG CCC TTC CAG CAG CCC TTC CAG CCC CAG GCC ATT CCA CCC CAG
GLN PRO PHE GLN GLN PRO PHE GLN PRO GLN ALA ILE PRO PRO GLN

TCT CAT CAG CCC ATG CAG CCC CAG TCA CCT CTG CAT CCC ATG CAG
SER HIS GLN PRO MET GLN PRO GLN SER PRO LEU HIS PRO MET GLN

CCC CTG GCA CCA CAG CCA CCT CTG CCT CCA CTG TTC TCC ATG CAG
PRO LEU ALA PRO GLN PRO PRO LEU PRO PRO LEU PHE SER MET GLN

CCC CTG TCC CCC ATT CTT CCT GAG CTG CCT CTG GAA GCT TGG CCA
PRO LEU SER PRO ILE LEU PRO GLU LEU PRO LEU GLU ALA TRP PRO

GCG ACA GAC AAG ACC AAG CGG GAA GAA GTG GAT TAA
ALA THR ASP LYS THR LYS ARG GLU GLU VAL ASP stop

AAAATTCAGAAAATGAGAGAACCGAAGTGGATACTTTGGTTGTTTTTAGGAATAACTCAA
CACAAATGATTTGTGCCTACAATCACTTAGTAAATTCGTAACTAAAAATAAGTATCATTAA
GCAGATAATAAAAATGTTTGAAAAATCAAAAAAAAAAAAAACCCCCCCCCCCCTGCA

(adenylation signal) (poly-d(A) tail)

```

図5：Sneadらにより決定されたマウスアメロゲニン cDNA (clone pMa5-5) のヌクレオチド配列と154残基のアミノ酸配列⁴¹⁾：5'末端側をコードしている81塩基が欠けているため26残基のアミノ酸が記録されていない。

アミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を決定した。

最も長い λ Am16 クローンは 700 bp で、アミノ末端から 32 番目までのアミノ酸をコードする塩基が欠如している以外は停止コドンまで完全な配列であった。しかしすでに報告²³⁾されているアミノ酸配列 (170 残基) と比較し 8 残基、クラスターとして 139—163 残基について矛盾点、C—末端側に 12 残基の付加があった。また、 λ Am16 とハイブリ

ダイズするエナメル芽細胞の mRNA は少なくとも 4 種のアメロゲニンをコードしていることがタンパク合成系のゲル電気泳動とアメロゲニンの抗体染色によって同定された。アメロゲニンが不均一性を示す理由として mRNA のプロセッシングが相違する可能性を示した。さらに下川⁴³⁾は同様な方法により 216 個のアミノ酸からなる分子量 24,500 のウシアメロゲニンをコードする cDNA の塩基配列を決定し (図 6)、生合成、分泌、結晶形

```

CGGGAAACTCACTGAAACGTGTGTTCAAGGGCT
-19                               -10                               -1
ATG CCG AAA TGG GGA CCT TGG ATT TTG TTT GCC TGC CTC CTG GGA GCA GCC TTC TCT
Met Pro Lya Trp Gly Pro Trp Ile Leu Phe Ala Cys Leu Leu Gly Ala Ala Phe Ser
1                               11                               20
ATG CCT CTA CCA CCT CAT CCT GGG CAC CCT GGT TAT ATC AAC TTC AGC TAT GAG GTG CTC
Met Pro Leu Pro Pro His Pro Gly His Pro Gly Tyr Ile *Asn Phe Ser Tyr Glu Val Leu
21                               31                               40
ACC CCT CTG AAG TGG TAC CAG AGC ATG ATA AGA CAC CCG TAC CCT TCC TAT GGT TAC GAA
Thr Pro Leu Lys Trp Tyr Gln Ser Met Ile Arg His Pro Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Glu
41                               51                               60
CCC ATG GGT GGA TGG CTG CAC CAC CAA ATC ATT CCC GTG GTG TCC CAG CAG ATC CCC CAG
Pro Met Gly Gly Trp Leu His His Gln Ile Ile Pro Val Val Ser Gln Gln Thr Pro Gln
61                               71                               80
AAT CAC GCC CTG CAG CCT CAT CAC CAC ATC CCC ATG GTG CCA GCT CAG CAG CCC GTG GTC
Asn His Ala Leu Gln Pro His His His Ile Pro Met Val Pro Ala Gln Gln Pro Val Val
81                               91                               100
CCC CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT CCT GGC CAA CAC TCC ATG ACT CCA ACC CAA CAC CAC
Pro Gln Gln Pro Met Met Pro Val Pro Gly Gln His Ser Met Thr Pro Thr Gln His His
101                              111                              120
CAG CCA AAC CTC CCT CTG CCC GCC CAG CAG CCC TTC CAG CCC CAG TCC ATC CAG CCG CAG
Gln Pro Asn Leu Pro Leu Pro Ala Gln Gln Pro Phe Gln Pro Gln Ser Ile Gln Pro Gln
121                              131                              140
CCT CAC CAG CCC CTG CAG CCT CAC CAG CCC CTG CAG CCC CTG CAG CCC ATG CAG CCC TTG
Pro His Gln Pro Leu Gln Pro His Gln Pro Leu Gln Pro Leu Gln Pro Met Gln Pro Leu
141                              151                              160
CAG CCC CTG CAG CCC CTG CAG CCC CAG CCA CCT GTG CAC CCC ATC CAG CCC TTG CCG CCA
Gln Pro Leu Gln Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro Val His Pro Ile Gln Pro Leu Pro Pro
151                              171                              180
CAG CCA CCT CTG CCT CCG ATA TTC CCC ATG CAG CCT CTG CCC CCC ATG CTT CCT GAC CTG
Gln Pro Pro Leu Pro Pro Ile Phe Pro Met Gln Pro Leu Pro Pro Met Leu Pro Asp Leu
181                              191
CCT CTG GAA GCT TGG CCA GCA ACA GAC AAG ACC AAG CGG GAG GAA GTG GAT TAA AAGATCA
Pro Leu Gln Ala Trp Pro Ala Thr Asp Lys Thr Lys Arg Glu Glu Val Asp stop

GAAAATGAGAAGAGACCTGAAATAAATACTTGCCAGTTGCTTTTCAGAAAGACACAAGAACACAAAAGATTTTTCTACCA
CCACCTTACTTAGTAAATTCGTAACTAAAAATAAGCAAACAATAAAAAATAAGCAAACAATAAAAAACCGTTTAAAAATA
CAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 6 : ウシアメロゲニン cDNA の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列⁴³⁾ : 番号は分泌されたアメロゲニンの N 末端を 1 とし、シグナルペプチドにはマイナス符号をつけて表した。

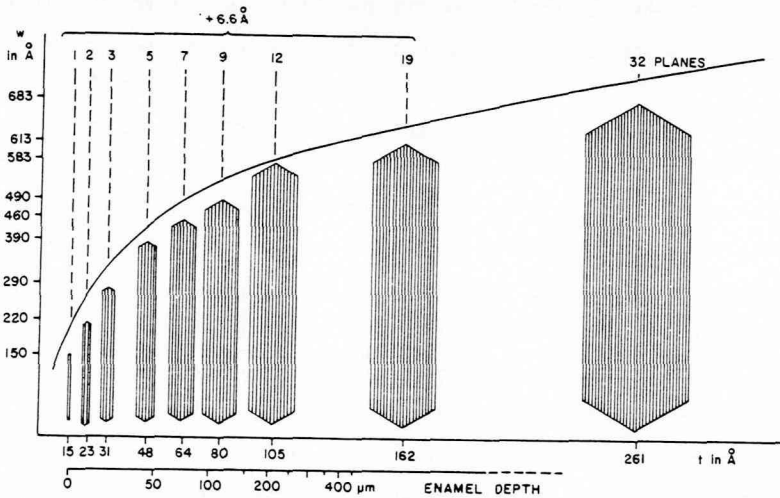
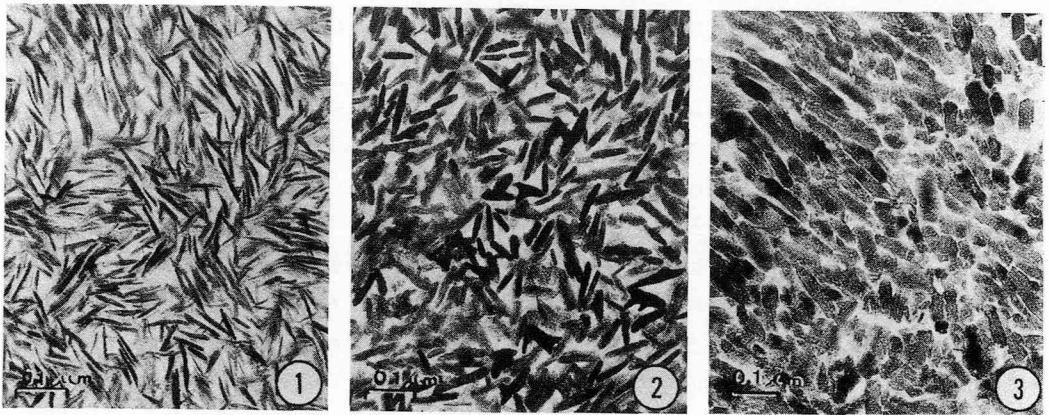
*および#印はそれぞれ N-linked, O-linked glycosylation の可能性のある場所を示した。また、#印のセリンはリン酸化されている可能性もある。オーバーラインで示した AATAAA の配列はポリ A シグナルである。

成への役割りなどについて意見を述べ、アモロゲン研究の将来への展望を行なった。

エナメル質の石灰化とエナメルタンパク質の作用

エナメルタンパク質がエナメル質結晶の核形成や、成長と如何にかかわりあっているかは興味深い問題である。エナメル結晶の形成にアモロゲンとエナメルリンという2種類のタンパク質が存在しなければならぬ必然性が説明されなければならない。

ブタアモロゲンのヒドロキシアパタイトへの吸着の状態と結晶核成長への影響が研究された結果⁴⁴⁾、エナメル芽細胞から分泌されたアモロゲン(25 K)と高分子組成(60-90 K)はヒドロキシアパタイトへの強い親和性を示し、超飽和溶液 $(Ca^{2+})^5(OH^-)(PO_4)^3 = 7.45 \times 10^{10}$ で結晶核の成長を阻害していることがわかった。ところが、部分分解された20 Kのアモロゲンはヒドロキシアパタイトへの吸着性は低下し、結果として成長阻害効果もなかった。吸着のpHは6.0と7.4であ



“Sheath” noticeable and included in measurements of crystallites up to a thickness of 19 or 20 lattice planes. This “sheath” is no longer noticeable in the mature enamel crystallite presenting 32 lattice planes. *t*, thickness; *w*, width.

図7：ヒト幼若エナメル質における結晶の成長：写真と型、サイズの変化の模式図⁴⁷⁾

- ① トームス突起よりおよそ25μmの位置の結晶(平均サイズ) 31 Å(厚さ)×290 Å(幅)
- ② トームス突起よりおよそ200μmの位置の結晶(平均サイズ) 105 Å(厚さ)×580 Å(幅)
- ③ 萌出歯の完成したエナメル質の結晶(平均サイズ) 261 Å(厚さ)×683 Å(幅)

り pH7.8あるいは10.8ではおこらなかった。分泌されたアメロゲン (25 K) によりエナメル質形成が調節されていることを示唆した。一方、アメロゲンとエナメルリンを使用し、核形成実験と結晶成長実験についての報告がある⁴⁵⁻⁴⁶。核の形成、すなわち非晶性リン酸カルシウム (ACP) の形成に対して約3時間は安定な準安定濃度の溶液 (総カルシウム1.3 mM, 総リン酸1.0 mM) にアメロゲン (分子量27,000) を0.6 μ M 存在させると溶液は約5時間安定となり、対照にくらべ非晶性リン酸カルシウムの生成を遅延する。エナメルリンが0.6 μ M 存在する場合の結果は、アメロゲンが2.5 μ M 存在する場合に類似しており、ACPの生成を約4倍強く阻害する。結晶の成長についてはアメロゲン (分子量27,000) が μ M 濃度存在すると対照にくらべ、結晶成長が抑制されている。エナメルリンはさらに抑制効果が強かった。

ヒト胎児歯胚の幼若エナメル質をトームスの突起からそれぞれ25, 250, 500 μ m の部位における結晶成長を電子顕微鏡で観察した研究⁴⁷では、結晶形成初期の針状が六方晶ブリズムに成長する過程 (図7) で、単位面積 (μ m²) 当りの結晶数は1240から558に減少する。結晶成長につれ格子面数は増加する。さらに結晶の両側にそれぞれ3.3 Åの厚さの“鞘”を観察しているが、結晶中の成長が停止した段階では“鞘”は確認できなくなる。この点に関し、Daculsi と Kerebel は結晶表面で低分子化し分散した人工産物のタンパク質に基づく可能性を述べている。この像がアメロゲンに基づく説明可能ならば結晶形成を調節し、結晶完成後にアメロゲンは消失する実験結果と一致すると考えられる。

一方エナメルリンは機械的な衝突や結晶の配列の乱れなどをより少なくする緩衝剤あるいは接着剤として、最少必要量が結晶間に残存したと考える。

おわりに

エナメル質を形成する分泌機能をもつたエナメル芽細胞は、内エナメル上皮細胞から分化する。アメロゲンとエナメルリンという特異的なタンパク質はこの細胞が生合成し、エナメル基質の形成のために分泌される。幼若エナメル質には20%ものタンパク質が存在するが、石灰化が終了した萌出歯では1%以下のタンパク質が残存するに過ぎ

ない。エナメルタンパク質はこの過程で結晶の成長を調整しているのであろう。

アメロゲンはアミノ酸が170残基、あるいは180残基配列した分子量約20,000で、プロリン (約30%)、グルタミン、ロイシン、ヒスチジン含量が高い。エナメルリンは分子量がアメロゲンより高く、アミノ酸組成も相違し、免疫交差反応性からもアメロゲンと異なるタンパク質と考えられる。プロリン含量の高いタンパク質の例として、コラーゲンがあげられるが、コラーゲンが特異的な三重ヘリックス構造であるのに対し、アメロゲンはプロリン残基による β -シート、 β -ターン構造を約50%含む、特異的な二次構造を示すタンパク質である。

唾液中の高プロリン含有タンパク質などと共にホルモンやペプチド中におけるプロリン残基の存在意義は興味深く、エナメルタンパク質もこの範ちゅうにはいる。筆者⁴⁸はプロリンを認識し、ペプチドやタンパク質を加水分解する酵素に関心を持ち研究を行なっている。

原稿の整理は武井さんをお願いした。感謝の意を表します。

文 献

- 1) Deakins, M. (1942) Changes in the ash, water, and organic content of pig enamel during calcification. *J. Dent. Res.* 21: 429-435.
- 2) Piez, K. A. (1960) The nature of the protein matrix of human enamel. *J. Dent. Res.* 39: 712.
- 3) Piez, K. A. (1961) Amino acid composition of some calcified protein. *Science*, 134: 841-842.
- 4) Glimcher, M. J., Mechanic, G., Bonar, L. C. and Daniel, E. J. (1961) The amino acid composition of the organic matrix of decalcified fetal bovine dental enamel. *J. Biol. Chem.* 236: 3210-3213.
- 5) Eastoe, J. E. (1963) The amino acid composition of proteins from the oral tissue-II The matrix proteins in dentine and enamel from developing human deciduous teeth. *Arch. Oral Biol.* 8: 633-652.
- 6) Eastoe, J. E. (1965) The chemical composition of bone and teeth. *Advan. Fluorine Res. Dent. Caries Prevent.* 3: 5-17.
- 7) Eggert, F. M., Allen, G. A. and Burgess, R. C. (1973) Purification and partial characterization of proteins from developing bovine dental enamel. *Biochem. J.* 131: 471-484.

- 8) Mechanic, G. (1971) The multicomponent re-equilibrating protein system of bovine embryonic enamel (dental enamel protein): chromatography in deaggregating solvents. Ed. by Fearnhead, R. W. and Stack, M. V., *Tooth Enamel II* 88-94. John Wright & Sons, Bristol.
- 9) Eastoe, J. E. (1971) Dental enamel. Ed. by Florin, M. and Stotz, E. *Comprehensive Biochemistry*, 26 C : 785-834. Elsevier, Amsterdam.
- 10) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M. and Nylén, M. U. (1989) Proteins of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principle molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem.* 255: 9760-9768.
- 11) *Tooth Enamel IV* (1984) Ed. by Fearnhead, R. W. and Suga, S. Elsevier, Amsterdam.
- 12) エナメル質, その形成, 構造, 組成と進化(1987) 須賀昭一編, クインテッセンス出版, 東京.
- 13) 清水正春 (1987) エナメル質中のタンパク質 文献12) 139-152.
- 14) Glimcher, M. J., Mechanic, G. L. and Friberg, U. A. (1964) The amino acid composition of the organic matrix and the neutral-soluble and acid-soluble components of embryonic bovine enamelin. *Biochem. J.* 93 : 198-202.
- 15) Glimcher, M. J., Fariberg, U. A. and Levine, P. T. (1964) The isolation and amino acid composition of the enamel proteins of erupted bovine teeth. *Biochem. J.* 93 : 202-210.
- 16) Fukae, M., Tanabe, T., Ijiri, H. and Shimizu, M. (1980) Studies on porcine enamel proteins: A possible original enamel protein. *Tsurumi U. Den. J.* 6 : 87-94.
- 17) Limeback, H. (1987) Isolation and characterization of pig enamelines. *Biochem. J.* 243 : 385-390.
- 18) Fincham, A. G., Belcourt, A. B. and Termine, J. D. (1983) Molecular composition of the protein matrix of developing human dental enamel. *J. Dent. Res.* 62 : 11-15.
- 19) Zeichner-David, M., Macdougall, M., Vides, J., Snead, M. L., Slavkin, H. C. Turkel, S. B. and Pavolova, Z. (1987) Immunochemical and biochemical studies of human enamel proteins during neonatal development. *J. Dent. Res.* 66 : 50-56.
- 20) Strawich, E., Poon, P. H., Renugopalakrishnan, V. and Glimcher, M. J. (1985) Relative molecular mass determination of a major, highest relative molecular mass extracellular amelogenin of developing bovine enamel. *FEBS Lett.* 184 : 188-192.
- 21) Menanteau, J., Mitre, D. and Daculsi, G. (1984) Aqueous density fractionation of mineralization tissues: An efficient method applied to the preparation of enamel fractions suitable for crystal and protein studies. *Calcif. Tissue Int.* 36 : 677-681.
- 22) Fincham, A. G., Belcourt, A. B., Termine, J. D., Butler, W. T. and Cothran, W. C. (1983) Amelogenins. Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem. J.* 211 : 149-154.
- 23) Takagi, T., Suzuki, M., Baba, T., Minegishi, K. and Sasaki, S. (1984) Complete amino acid sequence of amelogenin in developing bovine enamel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 : 592-597.
- 24) Lyaruu, D. M., Belcourt, A., Fincham, A. G. and Termine, J. D. (1982) Neonatal hamster molar tooth development: extraction and characterization of amelogenins, enamelines, and soluble dentin proteins. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 86-89.
- 25) Menanteau, J., Mitre, D. and Raheer, S. (1986) An in-vitro study of enamel protein degradation in developing bovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 31 : 807-810.
- 26) 須賀昭一 (1987) エナメル基質タンパク質の組織化学 文献12) 163-173.
- 27) Bonar, L. C., Grynpsas, M. D. and Glimcher, M. J. (1984) Failure to detect crystalline brushite in embryonic chick and bovine bone by x-ray diffraction. *J. Ultrast. Res.* 86 : 93-99.
- 28) Renugopalakrishnan, V., Strawich, E. S., Horowitz, P. M. and Glimcher, M. J. (1986) Studies of the secondary structures of amelogenin from bovine tooth enamel. *Biochemistry*, 25 : 4879-4887.
- 29) Chang, C. T., Wu, C. -S. and Nevskaya, N. A. (1976) Circular dichroic analysis of protein conformation: *Anal. Biochem.* 91 : 13-31.
- 30) Zheng, S., Tu, A. T., Renugopalakrishnan, V., Strawich, E. and Glimcher, M. J. (1987) A mixed beta-turn and beta-sheet structure for bovine tooth enamel amelogenin: Raman spectroscopic evidence. *Biopolymers*, 26 : 1809-1813.
- 31) Christner, P. J., Lally, E. T., Ads, A. H. and Herold, R. C. (1983) Production of a monoclonal antibody to bovine tooth enamel proteins. *Arch. Oral Biol.* 28 : 773-779.
- 32) Christner, P. J., Lally, E. T., Miller, R.D., Lenotzich, P., Rosenbloom, J. and Herold R. C. (1985)

- Monoclonal antibodies to different epitopes in amelogenins from fetal bovine teeth recognize high-molecular-weight components. *Arch. Oral Biol.* **30**: 849-854.
- 33) Rosemblood, J., Lally, E., Dixon, M., Spencer, A. and Herold, R. (1986) Production of a monoclonal antibody to amelins which does not cross-react with amelogenins. *Calcif. Tissue Int.* **39**: 412-415.
 - 34) Lau, E. C., Bessem, C. C., Slavkin, H. C., Zeichner-David, M. and Snead, M. L. (1987) Amelogenin antigenic domain defined by clonal epitope selection. *Calcif. Tissue Int.* **40**: 231-237.
 - 35) Snead, M. L., Lau, E. C., Zeichner-David, M., Fincham, A. G., Woo, S. L. C. and Slavkin, H. C. (1985) DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveal the amino acid sequence for enamel-specific protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**: 812-818.
 - 36) Baba, T., Oida, S., Shimokawa, H. and Sasaki, S. (1986) Determination of bovine enamel protein by enzyme-linked immuno-adsorbent assay. *Arch. Oral Biol.* **31**: 171-174.
 - 37) Zeichner-David, M., Slavkin, H. C., Lyaruu, D. M. and Terminn, J. D. (1983) Biosynthesis and secretion of enamel proteins during hamster tooth development. *Calcif. Tissue Int.* **35**: 366-371.
 - 38) Strawich, E. and Glimcher, M. J. (1985) Synthesis and degradation in vivo of a phosphoprotein from rat dental enamel. Identification of a phosphorylated precursor protein in the extracellular organic matrix. *Biochem. J.* **230**: 423-433.
 - 39) Shimokawa, H. and Sasaki, S. (1978) Study on the biosynthesis of bovine enamel protein in vitro. *J. Dent. Res.* **57**: 133-138.
 - 40) Bronckers, A. L. J. J. and Woltgens, J. H. M. (1985) Short-term effects of fluoride on biosynthesis of enamel-matrix proteins and dentine collagens and on mineralization during hamster tooth-germ development in organ culture. *Arch. Oral Biol.* **30**: 181-191.
 - 41) Snead, M. L., Zeichner-David, M., Chandra, T., Robson, K. J., Woo, S. L. C. and Slavkin, H. C. (1983) Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **80**: 7254-7258.
 - 42) Shimokawa, H., Soble, M. E., Sasaki, M., Termine J. D. and Young, M. F. (1987) Heterogeneity of amelogenine mRNA in the bovine tooth germ. *J. Biol. Chem.* **262**: 4042-4047.
 - 43) 下川仁弥太 (1988) 遺伝子工学的的手法によるエナメルタンパク質(Amelogenin)の研究. *歯医学誌*, **7**: 36-45.
 - 44) Aoba, T., Fukae, M., Tanabe, T., Shimizu, M. and Moreno, E. C. (1987) Selective adsorption of porcine-amelogenins onto hydroxyapatite and their inhibitory activity on hydroxyapatite growth in supersaturated solutions. *Calcif. Tissue Int.* **41**: 281-289.
 - 45) Doi, Y., Eanes, E. D., Shimokawa, H. and Termine, J. D. (1984) Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and amelogenin proteins in vitro. *J. Dent. Res.* **63**: 98-105.
 - 46) 土井 豊 (1987) エナメルタンパクなどのアパタイト結晶の成長と発育に及ぼす影響. *文献12* 202-211.
 - 47) Daculsi, G. and Kerebel, B. (1978) High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: size, shape, and growth, *J. Ultrast. Res.* **65**: 163-172.
 - 48) Harada, M., Hiraoka, B. Y., Mogi, M., Fukasawa, K. and Fukasawa, K. M. (1988) High-performance liquid chromatographic separation of peptides possessing a proline residue in the amino-terminal penultimate position, and their products generated by enzymatic hydrolysis. *J. Chromatogr.* **424**: 129-135.