

[原著] 松本歯学 31:160~166, 2005

key words: ウマセメント質—プロトカドヘリン18—EDTA可溶画分—プロコラーゲン $\alpha$ 1

## ウマ臼歯セメント質中のプロトカドヘリン18様物質の同定

深澤加與子<sup>1</sup>, 佐原 紀行<sup>1</sup>, 森山 敬太<sup>1</sup>, 久野 知子<sup>2</sup>, 藤井 慈貴<sup>3</sup>,  
音琴 淳一<sup>2</sup>, 太田 紀雄<sup>2</sup>, 宇田川信之<sup>4</sup>, 矢ヶ崎 裕<sup>1</sup>, 小澤 英浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学

<sup>2</sup>松本歯科大学 歯科保存学第一講座

<sup>3</sup>角田歯科医院

<sup>4</sup>松本歯科大学 口腔生化学講座

### Identification of Protocadherin 18-like Protein in Horse Molar Cementum

KAYOKO M FUKASAWA<sup>1</sup>, NORIYUKI SAHARA<sup>1</sup>, KEITA MORIYAMA<sup>1</sup>,  
TOMOKO KUNO<sup>2</sup>, SHIGETAKA FUJII<sup>3</sup>, JUNICHI OTOGOTO<sup>2</sup>, NORIO OHTA<sup>2</sup>,  
NOBUYUKI UDAGAWA<sup>4</sup>, HIROSHI YAGASAKI<sup>1</sup> and HIDEHIRO OZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, School of Dentistry*

<sup>2</sup>*Department of Periodontology, Matsumoto Dental University, School of Dentistry*

<sup>3</sup>*Tsunoda Dental Clinic*

<sup>4</sup>*Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental University, School of Dentistry*

### Summary

Cementum plays an important role in tooth regeneration; however, the organization system has not yet been clarified. We have studied odontoclastic resorption in human deciduous teeth, and found that the cementum completely covers the enamel tissues of horse molar teeth. In order to study the regeneration system of cementum, an EDTA soluble fraction extracted from horse cementum was analyzed.

The 30 kDa protein was isolated from the EDTA fraction of horse cementum by hydroxyapatite chromatography and SDS-PAGE. Tryptic peptides obtained by Edman degradation of the 30 kDa protein were QDTGPRGPRGPAGP(1), GXRGFSLDGVK(2) and GYEFVITE-HXLA(3). A search of the UniProt protein sequence database with peptide 1 and peptide 2 showed significant similarity to the two regions of Procollagen  $\alpha$  1 chain, residues 115-128 (93%) and 266-277 (82%), respectively. The peptide 3 showed the highest similarity (85%) to the heptapeptide region of mouse Protocadherin 18. The 30 kDa protein would be a product from Type I collagen, a different splicing product translated from  $\alpha$  1 procollagen gene or a novel protein. Protocadherin 18 has not been identified in the oral tissues. This is the

first report to find a protocadherin 18-like protein in cementum.

Protocadherins are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adhesion molecules, and are highly expressed in the central nervous system. It is well known that protocadherins are involved in many biological processes such as tissue morphogenesis or cell differentiation events. Therefore, the protocadherin 18-like protein found in cementum might be expected to be involved in the regenerating system of cementum.

## 緒 言

歯周組織の修復機構では、歯根表面のセメント質の再生が最も重要な役割を果たしていると考えられている。最近、臨床でも用いられているエムドゲイン (Emdogain) は、セメント芽細胞の誘導能を持つと考えられているエナメル蛋白であり<sup>1,2)</sup>、歯根表面に無細胞セメント質の形成を誘導し、歯周組織の再生をしようとする試みである<sup>3,4)</sup>。

セメント質は骨と類似した組成を持っていると考えられている。しかし、現在でも骨芽細胞とセメント芽細胞が同様な細胞から分化するのか、両者の基質成分にはどのような差があるのか明確になっていない<sup>5)</sup>。その一つの理由は、骨と異なり、セメント質は歯根象牙質上に厚さ約20~200 $\mu\text{m}$ の薄層として限局しており、セメント質のみを採取し、生化学的に分析することが困難なためである。

ウマ臼歯は高冠歯でセメント質がエナメル質を完全に被覆し、歯冠に相当する部位ではセメント質は歯全体の約70%を占めている<sup>6)</sup> (図1)。今回我々は、ウマ臼歯を咬合平面に水平に約1 mmで薄切し、それぞれの切片から歯科用タービンを

用いエナメル質表層に沿って切断し、セメント質だけを多量に採取することに成功した。さらに、骨との組成を比較検討するため、骨組織を同一のウマ下顎骨から採取した。

本研究の目的は、歯周組織の修復機構の解明に向けての第一歩として、セメント質基質内の蛋白を分析し、セメント質と骨組織との相違を明らかにすると共に、セメント質に特異的な物質を同定することである。

## 方 法

### 材料の調製

食肉センターから購入したウマ下顎から、臼歯ならびに顎骨を分離した。それぞれ付着軟組織を除去した。顎骨はそのまま、歯は横断スライス後、セメント質部分を分離し、それぞれ細粉とした。

エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) 脱灰によるタンパク質の可溶化

1. 洗浄: 10 g のセメント質粉末に、タンパク分解酵素阻害剤 (0.05 M Amino-n-capric acid, 0.005 M Benzamidine hydrochloride, 0.001 M Phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.001 M Iodoacetic acid, and 1.0 mg/l Trypsin inhibitor) を含む0.05 M トリス酢酸緩衝液, pH 7.4 (A 緩衝液とする) 500 ml を加え, 4 $^{\circ}\text{C}$  で, 一昼夜攪拌後, ろ過した。この洗浄操作を3回行った。
2. グアニジン抽出: 洗浄済みセメント質粉末に, 4 M グアニジンを含む A 緩衝液500 ml を加え, 4 $^{\circ}\text{C}$  で, 一昼夜攪拌後, 15,000 xg, 10 分間遠心した。分離した上清は A 緩衝液で十分透析後, ビバフロー-50 (10,000 MWCO, 家田貿易株式会社) で濃縮し, グアニジン抽出画分 (HCGF) とした。同様の操作を2回行った残渣を EDTA 抽出の材料とした。

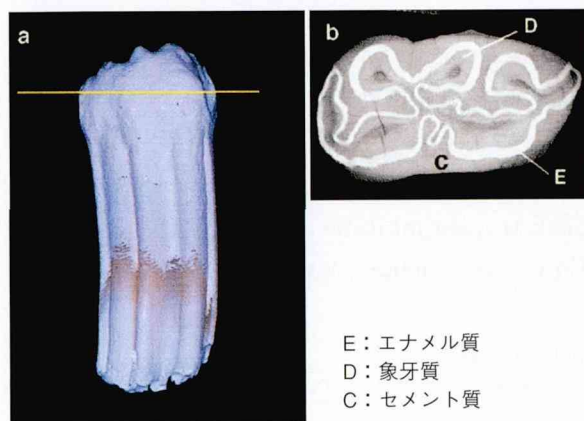


図1: ウマ下顎第4小白歯の全体像(a)と線で示した部位の $\mu\text{CT}$ による横断像

3. EDTA抽出：グアニジン抽出残渣に0.5 M EDTA (pH 7.4) を含むA緩衝液500 mlを加え、4℃で、一昼夜攪拌後、15,000 xg, 10分間遠心した。残渣は、同様の操作をさらに、2回繰り返した。上清を集め、EDTA抽出画分(HCEF)とし、A緩衝液で十分透析後、10 mlに濃縮した。
4. 顎骨粉末は、セメント質粉末と同様に1~3の処理をし、EDTA抽出画分(HBEF)を抗体作製ならびに各種分析に用いた。

#### タンパク質量の測定

ウシ血清アルブミンを標準に、Lowry-Hartree法<sup>7)</sup>で測定した。またタンパク質量の相対比較のため、吸光度測定(280 nm;  $E^{0.1\%} = 0.5$ )を行った。

#### ウマセメント質タンパク質の部分精製

ヒドロキシアパタイト (CHT Ceramic Hydroxyapatite Typ II, BIO-RAD社) 3.0 gを200 mM 第二リン酸ナトリウム溶液、pH 9-10に懸濁後、カラムに充填(1.2 x 5.0 cm)した。100 mlの10 mM リン酸緩衝液、pH 6.8で平衡化したカラムに、平衡化緩衝液で十分透析した、ウマセメント質EDTA可溶画分HCEF(20 mgタンパク質量)を添加した。カラムの5倍量の同緩衝液で洗浄し、これを集めて、未吸着画分とした後、50 mM, 100 mM, 200 mMの各リン酸緩衝液、pH 6.8で溶出し、各分画をそれぞれ集めた。ウマ顎骨EDTA可溶画分HBEF(20 mgタンパク質量)も同様にヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを行った。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)とウエスタンブロット

ヒドロキシアパタイトカラムクロマトで部分精製したウマセメント質の各分画を、Laemmli<sup>8)</sup>の方法に従って、SDS-PAGEでさらに分画した。12%スラブゲルでPAGE後、Coomassie R 250で染色した。ゲルからタンパク質バンドを切り取り、免疫原とした。また同様にPAGE後、エレクトロブロッティングによりPVDF-膜(Immunoblot membrane, BIO-BAD社)に転写した。膜はCoomassie R 250で染色後、タンパクバンドを

切り取り、アミノ酸分析をした。

分子量マーカーとして、Prestained SDS-PAGE Standards (BIO-RAD社, Myosin; 203,000,  $\beta$ -galactosidase; 120,000, Bovine serum albumin; 90,000, Ovalbumin; 51,700, Carbonic anhydrase; 34,100, Soybean trypsin inhibitor; 28,000, Lysozyme; 20,000, Aprotinin; 6,400)を用いた。

#### 二次元電気泳動

一次元目は、プロテイン IEFセル (BIO-RAD社)で等電点電気泳動を行った。IPG ストリップ(11 cm, pH 3.0~10.0と7 cm, pH 3.0~6.0)は、(8 M Urea, 0.5% CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% Bio-Lytes, 0.001% Orange G)液で、一夜膨潤した後、試料(20~30  $\mu$ g/7 cm ストリップ, 30~50  $\mu$ g/11 cm)を添加し、バイオラッド社推奨の条件で泳動した。

等電点電気泳動後、ストリップは平衡化緩衝液 I (6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% Glycerol, 130 mM DTT)ならびに、平衡化緩衝液 II (6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% Glycerol, 135 mM Idoacetamide)で処理した後、Laemmli<sup>8)</sup>の方法に従って、二次元目のSDS-PAGE(10%ならびに5~20% Criterionゲル; BIO-RAD社)を行った。タンパク染色はSilver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用い、Merril<sup>9)</sup>の方法に従い、銀染色した。

2D SDS-PAGE 標準タンパク質溶液 (BIO-RAD社): Conalbumin (MW 76,000 pI 6.0, 6.3, 6.6); Bovine serum albumin (MW 66,200 pI 5.4, 5.6); Bovine muscle actin (MW 43,000 pI 5.0, 5.1); Rabbit muscle glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000 pI 8.3~8.5); Bovine carbonic anhydrase (MW 31,000 pI 5.9~6.0); Soybean trypsin inhibitor (MW 21,500 pI 4.5); Equine myoglobin (MW 17,500 pI 7.0)。

#### 抗体の作製

一種類の抗原に対し、二羽のウサギ(雄, 2 kg)を免疫した。顎骨EDTA抽出画分(タンパク量; 500~1000  $\mu$ g)と Freund's complete adju-

vant (ICN Biomedicals Inc.) を等量加え、エマルジョンとし、背部に皮内注射した。注射は1週間隔で4回おこなった。5週後、耳外縁静脈から採血した。抗体価を確認後、最後の注射をし、その1週後に全採血した。ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーで分離したセメント質画分を、さらにSDS-PAGE後、Coomassie-R250で染色されたタンパク質バンド(1. 分子量; 50 kDa 2. 分子量; 30 kDa 3. 分子量; 20 kDa)を切り取り、これらの抗体を、同様の方法で作製した。

IgGの分離と不溶化: 血液は37°C, 30分間、インキュベート後、8,000 xg, 10分間遠心し、血清を分離した。Protein A Sepharose (Amersham Biosciences社) アフィニティークロマトグラフィーで、IgGを分離した。1 mM 塩酸溶液200 mlで処理した後、0.5 M 食塩を含む、0.1 M 重炭酸緩衝液、pH 8.3 (緩衝液B) に懸濁した、1.6 gのCNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences社)と、緩衝液Bで透析した、30 mgのIgGを室温で、1時間反応し、IgG-Sepharoseを作製した。この不溶性抗体は0.1 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.0で2時間処理後、0.5 M 食塩を含む0.1 M 酢酸緩衝液、pH 4.0と0.5 M 食塩を含む0.1 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.0で洗浄し、これをさらに2回繰り返した後、0.15 M 食塩を含む、0.1 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.0 (緩衝液C) で平衡化した。

イムノアフィニティークロマトグラフィー: ①ウマ顎骨 EDTA 可溶画分 HBEF (10.0 mg) を緩衝液、pH 8.0で十分透析後、同緩衝液Cで平衡化した、抗-HBEF-IgG-Sepharose (1.0 x 5.0 cm) に、6.0 ml/1時間の流速で添加した。100 mlの緩衝液Cで洗浄し、全溶出液を集め、濃縮したものを、未吸着画分とした。吸着タンパク質は、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.2) で溶出し、直ちに、1.0 M トリス塩酸、pH 8.0 緩衝液で中和した。試料ならびに、未吸着画分は、280 nmの吸光度を測定し、タンパク質量の比較をした。ウマセメント質 EDTA 可溶画分 (HCEF, 10.0 mg) も顎骨と同様の操作をした。②HCEFから、抗-(30 kDa-SDS-PAGEバンド) IgG-Sepharoseでイムノアフィニティークロマトグラフィーを行い、セメント質30 kDa

タンパク質を精製した。

#### アミノ酸分析と部分アミノ酸配列の決定

PVDF膜にプロットされたタンパク質は、チューブ(6 x 50 mm)に入れ、窒素置換後減圧密封し、6 N HCl 蒸気下で、105°C, 24時間、加水分解した。アミノ酸分析は、フェニルイソチオシアネートとアミノ基のカップリング反応で生成するフェニルチオカルバモイルアミノ酸を、逆相分配クロマトグラフィーで分画同定する<sup>10)</sup>、PICO-TAG アミノ酸分析計 (ウォーターズ社) で分析した。HCEFから、イムノアフィニティークロマトグラフィーで精製した、30 kDa タンパク質の内部アミノ酸配列解析は、島津製作所に分析を依頼し、Edman 分解法で決定した。

#### 結果と考察

##### 1. EDTA 溶液による可溶化

乾燥重量10 gのウマセメント質から46.0 mgのタンパク質が0.5 M EDTA 溶液処理で可溶化した。可溶性画分のSDS-PAGEゲルのタンパク質染色では、分離したバンドは形成されなかった。等電点3.0~10.0での、二次元電気泳動の結果、ほとんどの染色スポットは、等電点が3.5~5.5に分布する酸性タンパク質であった。ウマ顎骨も、セメント質とほぼ同量(乾燥重量に対し、0.47%)のタンパク質がEDTAで可溶化し、二次元電気泳動では、セメント質と量的に相違が見られたが同一のパターンを示した。図2に、セメント質のグアニジン抽出画分(A)とEDTA可溶画分(B)の、pI 3.0~6.0での二次元電気泳動銀染色結果を示した。セメント質 EDTA 脱灰で始めて、可溶化した7~9個のスポットが確認できた(図2-C)。これらのタンパク質は、EDTAで可溶化してくることから石灰化への関与の可能性が推察される。

##### 2. 免疫反応性

EDTA 可溶化画分の抗-HBEF-IgG-Sepharoseとのアフィニティークロマトグラフィーをした結果、骨(HBEF)は95%のタンパク質が結合したのに対して、セメント質(HCEF)は、まったく結合しなかった。0.15 M 食塩を含むリン酸緩衝液、pH 7.0でも同様の結果を得た。セメン

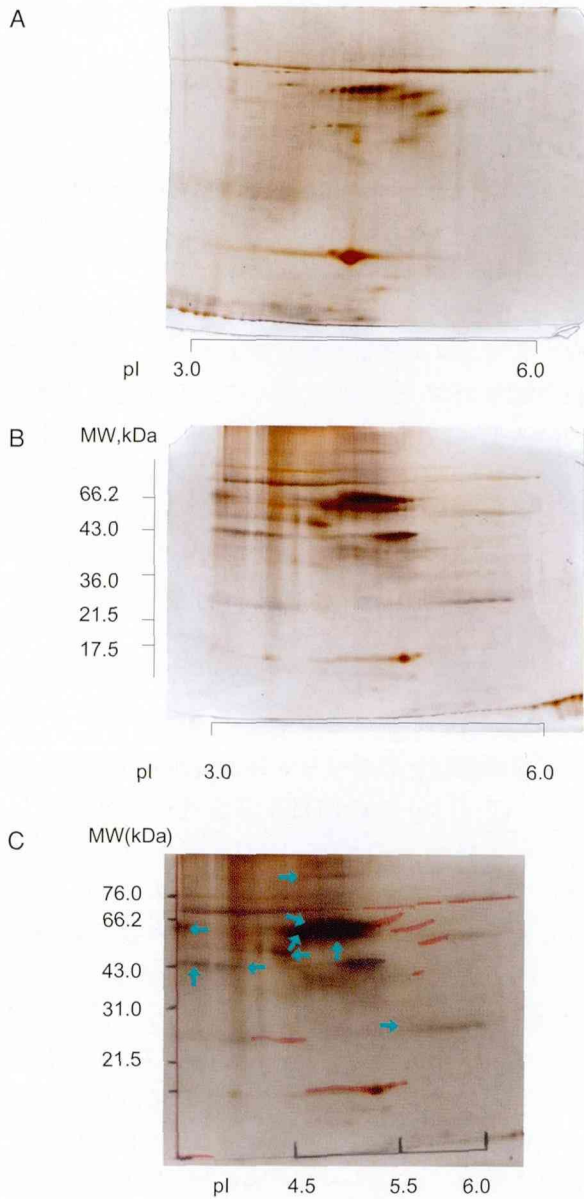


図2：ウマセメント質の二次元電気泳動，銀染色像  
A； Guanidini抽出画分 (30  $\mu$ g).  
B； EDTA 抽出画分 (35  $\mu$ g).  
C； Bの泳動像上にAのスポットを重ねた。  
矢印； EDTA 抽出で初めて発現したスポット。

ト質と骨の EDTA 可溶化物質は，免疫反応性に相違があった。この結果は，mRNA のスプライシング，あるいはタンパク質のポストプロセッシングの過程に相違があることが予想できる。

### 3. ウマセメント質 EDTA 可溶画分の分画

EDTA 溶出タンパク質の精製で，陰イオン交換クロマトグラフィーならびにセファデックス G-150クロマトグラフィーによる分離は困難であった。ヒドロキシアパタイトカラムクロマト

表1：ウマ顎骨ならびにセメント質 EDTA 可溶画分のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる分画

画分 (タンパク質量)	セメント質 (mg)	顎骨 (mg)
添加量	20.00	20.00
未吸着画分	1.82	0.61
50 mM 溶出画分	2.34	2.75
100 mM 溶出画分	2.47	2.77
回収率 (%)	33.20	30.70

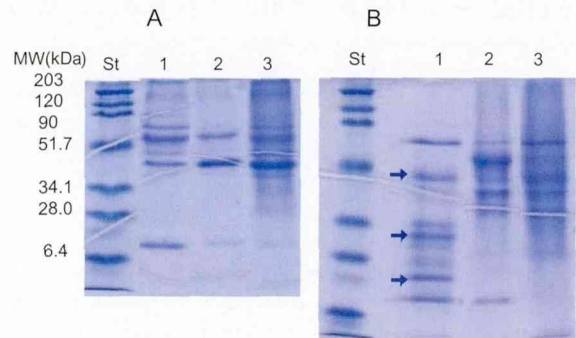


図3：ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー (CHT) の各画分の SDS-PAGE, クマシー染色像  
A；顎骨の EDTA 抽出画分, B；セメント質の EDTA 抽出画分。

St；分子量同定用標準タンパク質。  
1；CHT 未吸着画分 (10  $\mu$ g).  
2；CHT 50 mM 溶出画分 (10  $\mu$ g).  
3；CHT 100 mM 溶出画分 (10  $\mu$ g).

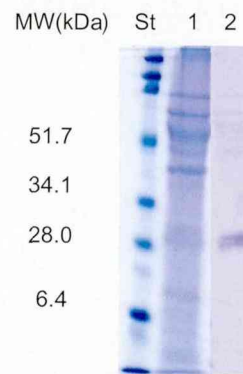


図4：ウマセメント質 EDTA 溶出画分の SDS-PAGE

St；分子量同定用標準タンパク質。  
1；クマシー染色 (10  $\mu$ g).  
2；イムノプロット反応 (5  $\mu$ g).

ラフィーでの分画結果を表1に示した。それぞれの画分の SDS-PAGE の電気泳動結果を図3に示した。骨ならびにセメント質とも，アパタイトクロマトグラフィーの回収率は，32.5%ならびに25.7%と低い，未吸着と50 mM 溶出画分は，SDS-PAGE でタンパク染色バンドが確認でき

た。しかし、骨では未吸着画分と吸着画分で差が見られないのに対し、セメント質では、未吸着と50 mM 溶出画分で完全に分画でき、特に未吸着画分は、骨では認められない、50 kDa, 30 kDa ならびに20 kDa のバンドが存在したため、これに注目した。これらの抗体を用いた、HCEF のイムノブロットング反応で、30 kDa 抗体のみが単一のバンドを示した(図4)ので、HCEF から、抗-(30 kDa-SDS-PAGE バンド) IgG-Sepharose を用いてイムノアフィニティークロマトグラフィーを行い、30 kDa タンパク質を単離した。

4. ウマセメント質30 kDa タンパク質の分析

30 kDa タンパク質の内部アミノ酸配列分析で3個のペプチド配列を決定した。ホモロジー検索の結果、ペプチド1と2は、ヒトコラーゲンα1鎖と、それぞれ、14残基中13残基、11残基中9残基、が一致し、82~93%のホモロジーを示した(表2)。50 kDa, 30 kDa ならびに20 kDa タンパク質のアミノ酸分析の結果、30 kDa タンパク質だけに、ヒドロキシプロリンが含まれ、その含有量は、Hyp 3.5%, Pro 9.8%ならびにGly 18%を示した。これらの分析結果は、30 kDa タンパク質が、コラーゲン線維形成前の段階のコラーゲンα1鎖が、EDTA で溶出してきているか、セメント質に特異的なコラーゲン様物質である、セメント質アタッチメントプロテイン (CAP)<sup>11)~14)</sup>か、あるいは、新奇のコラーゲン様物質である可能性を示した。

一方、ペプチド3はコラーゲン鎖とはまったく相同性はなく、検索の結果、プロトカドヘリン18(マウス、Pcdh 18)と最も高いホモロジーを示し、ヘプタペプチドのアミノ酸配列を比較する

と、ホモロジーは85%であった(表2)。これより、セメント質にプロトカドヘリン様物質の存在が示唆された。プロトカドヘリンは、カルシウム依存性細胞接着タンパク質カドヘリンファミリーのサブファミリーであり、中枢神経系の構築、細胞形態維持、形態発生に関与することが報告されている<sup>15),16)</sup>。しかし歯牙組織に関するカドヘリンの研究は、Heymann Rら<sup>17)</sup>のマウスの歯牙発生時の組織学的研究のみである。またPcdh 18は、Reelin-Dab 1のシグナル伝達系への関与が報告<sup>18)</sup>されていることから、Pcdh 18様物質がセメント質に存在するならば、セメント質の再生に、深く関与していることが推測される。

本研究で、セメント質特異的タンパク質と断定できる物質は同定できなかった。しかし、セメント質と骨では、タンパク質のプロセッシング過程に相違があることが予想された。またコラーゲン様物質あるいは、プロトカドヘリン18様物質がセメント質の再生に関与している可能性が示唆された。

結 論

歯周組織の修復にとって、セメント質は、重要な働きをしている。しかし、セメント質は一般的に含有量が少なく分離が困難なため、生化学的な研究はほとんど行われておらず、セメント質の特異性は明らかでない。ウマ臼歯は、セメント質がエナメル質を完全に被覆し、セメント質は、歯全体の70%を占めていることから、これを材料として、EDTA 溶出タンパク質の解析を行い、新たなタンパク質を同定すべく、本実験を行った。

EDTA 可溶画分の分画は、陰イオン交換クロマトグラフィーならびに、セファデックス G-150 クロマトグラフィーでは、困難であった。唯一、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーにより分画することができた。これをさらに、SDS-PAGE で分画し、30 kDa タンパク質を得た。このタンパク質の部分アミノ酸配列を分析した結果(ペプチド1: QDTGPRGPRGPAGP, ペプチド2: GXRGFSLDGVK), プロコラーゲンα1鎖のN-末端から、115~128番目ならびに266~277番目のペプチドと82~93%のホモロジーを示した。しかし、もうひとつのペプチド3 (GYEFVITEHXL A) は、プロトカドヘリン18 (マウ

表2:セメント質30 kDa タンパク質の内部アミノ酸配列

ペプチド 検索タンパク質	アミノ酸配列
ペプチド1 procollagen α 1	QDTGPRGPRGPAGP <sup>115</sup> GDTGPRGPRGPAGP <sup>128</sup>
ペプチド2 procollagen α 1	GXRGFSLDGVK <sup>266</sup> GHRGFSLDGAK <sup>277</sup>
ペプチド3 protocadherin 18	GYEFVITEHXL A <sup>470</sup> YEFVISE <sup>476</sup>

ス)と最も高いホモロジーを示し、ヘプタペプチド部分で85%であった。この分子は、I型コラーゲンの分解産物か、プロコラーゲン $\alpha$ 1遺伝子から、異なるスプライシング過程を経て生成したか、あるいは新奇の分子の可能性が考えられた。

現在まで、歯の組織でのプロトカドヘリン18の存在は示されておらず、本報告が初めて、その存在を示唆した。プロトカドヘリンは、中枢神経系の構築時や、形態発生時に高発現し、それらの生命現象に深く関与している、カルシウム依存性細胞接着タンパク質であることを考えると、このプロトカドヘリン18様物質がセメント質の修復に関与する可能性が高いと考えられる。

本研究は、平成15-16年度科学研究補助金(課題番号:155919383)で行った。

#### 文 献

- 1) Hammarstrom L (1997) Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* **24** : 658-68.
- 2) Hammarstrom L (1977) The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissue. *Ciba Found Symp* **205** : 246-55.
- 3) Sculean A, Reich E, Chiantella GC and Brex M (1999) Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain). A report of 32 cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* **19** : 157-63.
- 4) Yukna RA (2000) Mellonig JT. Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. A 10-case series. *J Periodontol* **71** : 752-9.
- 5) Bosshardt DD (2005) Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or unique phenotype? *J Dent Res* **84** : 390-406.
- 6) Killic S, Dixon PM, Kempson SA (1997) A light microscopic and ultrastructural examination of calcified dental tissues on horses : 4. Cementum and the amelocemental junction. *Equine Vet J* **29** : 213-9.
- 7) Hartree EF (1972) Determination of protein : A modification of the Lowly method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48** : 422-7.
- 8) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-5.
- 9) Merrill CR, Goldman D, Sedman SA and Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211** : 1437-8.
- 10) Cohen SA and Strydom DJ (1988) Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Anal Biochem* **174** : 1-16.
- 11) Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olson S and Narayanan SA (1992) Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and todental surface. *J Periodontal Res* **22** : 640-6.
- 12) McAllister B, Narayanan AS, Miki Y and Page RC (1990) Isolation of fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodont Res* **25** : 99-105.
- 13) Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M and Narayanan AS (1996) Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Mineral Res* **11** : 686-92.
- 14) Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T and Narayanan AS (2001) Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* **29** : 242-8.
- 15) Suzuki ST (2000) Recent progress in protocadherin research. *Exp Cell Res* **261** : 13-8.
- 16) Frank M and Kemler R (2002) Protocadherins. *Current Opinion in Cell Biology* **14** : 557-62.
- 17) Heymann R, Kallenbach S, Alonso S, Carroll P and Mitsiadis TM (2001) Dynamic expression patterns of the new protocadherin families CNRs and Pcdh- $\gamma$  during mouse odontogenesis : comparison with reelin expression. *Mech Develop* **106** : 181-4.
- 18) Homayouni R, Rice DS and Curran T (2001) Disabled-1 interactions with a novel developmentally regulated protocadherin. *Biochem Biophys Res Commun* **289** : 539-47.