

歯の形成とプロテアーゼの作用

原田 実

松本歯科大学 口腔生化学教室 (主任 原田 実 教授)

Tooth Development and Functional Aspects of Proteases

MINORU HARADA

Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. M. Harada)

Summary

During tooth development in tooth germs, a chain of reciprocal interactions between the epithelial and mesenchymal tissue regulates both morphogenesis and cell differentiation. Several extracellular matrix proteins such as fibronectin, tenascin, syndecan, collagens, and enamel proteins are thought to be involved in the tooth developing process on a timed schedule. The turnover of these proteins can be broken down with proteases in the tooth germs. In this review article, proteases related to degradation of extracellular matrix proteins including their properties are summarized.

はじめに

口腔の上皮細胞と神経堤に由来する間葉細胞の連続的な多岐にわたる相互作用が歯胚中で進行し、歯胚は細胞分化と形態変化を経て歯の形成が進行する^{1,2)}。歯胚は発生段階が蕾状期、帽状期、鐘状期と大別されている。鐘状期には基底膜をはさんで歯乳頭の間葉細胞が象牙芽細胞へ分化し、続いて内エナメル上皮細胞がエナメル芽細胞へ分化する。象牙芽細胞は、基質を分泌し石灰化(象牙質の形成)が進行し、次いでエナメル芽細胞がエナメル質の基質の分泌と石灰化を進め(エナメル質の形成)、生体で最も硬度の高い層が形成されるが、この過程ではエナメルタンパク質の分解と

除去が起こることはよく知られている^{3,4)}。最近、細胞外マトリックスの研究の著しい発展にもなって、歯の形成過程における細胞分化ならびに細胞間相互作用は細胞表面接着分子(CAMs)やマトリックス成分接着分子(SANs)に属する分子としてテネイシン、ラミニン、IV、V、VII型コラーゲン、フィブロネクチンその他、III型コラーゲン、シンデカン、EGF受容体などの分子が相互作用にかかわりをもっていることが明らかになって来た^{5,6)}。すなわち、細胞分裂の促進や細胞の分化にかかわるサイトカインの作用、さらに細胞の受容体との作用の研究で裏付けされたためと考える。

エナメルタンパク質、フィブロネクチン、III型コラーゲン、テネイシン、ラミニンなどは糖タンパク質に属し、シンデカンはプロテオグリカンに属する分子であり、細胞内における生合成、分泌、

細胞—細胞間における特異な作用、次いで酵素による分解の過程を経て代謝されることが考えられる。本稿では分解過程にかかわると考えられるプロテイナーゼすなわちタンパク質分解酵素とペプチダーゼについての報告をまとめ歯胚における歯の形成過程へのかかわりを考察した。

1. エナメル質の形成とプロテアーゼ

1. ゼラチン分解活性

エナメルタンパク質の特徴については本誌の総説⁷⁾に記載したが、1970年に研究がはじまると、ほぼ同時に分解活性についても報告された⁸⁾。生後6—8日のラット上顎第一大臼歯の歯胚中の活性をゼラチン—銀フィルム（感光フィルム）を基質として用いる方法で検索し、形成中のエナメル基質全域に強度のゼラチン分解活性が証明された。しかし、エナメル芽細胞層には長時間の反応によっても弱い活性が認められるのみであった。一方、象牙質ではエナメル—象牙境に接する狭い層で強い活性が証明されたが、石灰化象牙質には極めて僅かの活性が認められるのみで、エナメル基質に特異性が高かった。

2. 部分精製酵素とエナメルタンパク質の分解活性

ブタの幼若エナメル質から緩衝液(pH7.5)で抽出した可溶性成分から分解酵素を部分精製し、さらに残渣部分から酸脱灰後、部分精製したエナメルタンパク質を基質として使用し、両者の相互作用を検討した^{8,9)}。この結果、エナメルタンパク質分解活性の至適pHはおよそ6で、セリンプロテアーゼとしての性質を示したが、金属酵素の性質は示さなかった。

3. 精製酵素とその性質

ブタ幼若エナメル質から塩析、カラム操作を使用し、³H—アセチルカゼインと³H—アセチルエナメルタンパク質を基質として活性測定を行ない酵素を精製し、その性質を詳細に検討した¹⁰⁾。精製酵素の分子量は29,000で、12—15%の糖質を含有した。³H—アセチルエナメルタンパク質に対する至適pHは6.0—8.0の範囲にあり、阻害剤に対する作用からセリンプロテアーゼあり、Ca²⁺を必要としない。基質に関しては、酸化B鎖インスリンの分解サイトは—Cys—Gly—間と—Arg—Gly—間のペプチド結合と、人工基質であるNa—Bz—L

—Arg—ethyl esterに作用することからエンドペプチダーゼで、トリプシンファミリーに属することが示唆された。

4. エンザイモグラフによるプロテイナーゼの同定

特異な一種の酵素を精製してその性質を検討する研究に対して、組織中の全体の活性像を検討する上でエンザイモグラフは有効な方法である。

Overall と Limeback¹¹⁾は新鮮なブタ下顎臼歯永久歯胚を材料として、歯冠部が成長過程のエナメル質から、アメロゲニンとエナメルプロテイナーゼを抽出、部分精製して実験に供した。ゼラチンを基質としてエンザイモグラフを行なうと、分子量が各々62, 68, 92, 130kDaの位置にゼラチン分解活性を示す透明なバンドが観察された。しかも、エナメル質形成期の各段階にわたって同様の割合で認められた。しかし、この活性はアメロゲニン、カゼイン、アルブミンを基質とした場合は認められず、いずれも中性メタロプロテイナーゼであると判断した。

一方、エナメル質から抽出精製したアメロゲニンを基質としてエンザイモグラフで分解活性を検索すると、分子量31kDaと36kDaの位置に透明なバンド（不鮮明ではあるが）が観察できた。この活性はゼラチンとアルブミンに対しては検出されず、カゼインに対しては限定分解を示した。p—アミノフェニールマーキュリックアセテート（APMA）で阻害されるため、システィンプロテイナーゼの性質を示す。この活性はゼラチン分解活性とは異なり、成熟エナメル質にのみ発見された。以上のことから両者のタンパク質分解活性がエナメル質の形成にかかわっていることを推察した。

DenBesten と Heffernan¹²⁾もエンザイモグラフィを用い、ラット分泌エナメル質中にはゼラチンを基質として少なくとも7本、ウシの場合は6本のプロテアーゼ活性のバンドを同定した。このうち2本はエナメルタンパク質に対しても活性を示した。ラットの場合、エナメル有機質分泌期と成熟期の試料で相違があり、成熟期のエナメル質で検出される分子量23kDaと33kDaのバンドのうち後者はエナメルタンパク質に対しても活性を示した。

II. 歯胚のマトリックス成分とプロテアーゼ活性

1. 歯の萌出とプロテアーゼ活性

生犬を使用し、歯の萌出機構を外科的手法から、組織化学、生化学的方法まで多種にわたる研究方法で進めて来た Marks, Jr.¹³⁾, Gorski ら¹⁴⁾は歯胚周囲の歯槽骨が方向性を持って吸収・添加を起こすのは、歯小嚢 (dental follicle) に隣接する部位で調節されていることを結論づけた。さらに生化学的研究を発展させ、歯の形成、萌出過程における歯小嚢の細胞外マトリックス (extracellular matrix) 中のタンパク質成分の量的変化を検討し、このタンパク質を加水分解するプロテアーゼの存在を示唆し¹⁵⁾、続いて、マトリックスメタロプロティナーゼ (Matrix Metalloproteinases, (MMPs)) の存在を証明した¹⁶⁾。生後12, 14, 16, 18, 20週のビーグル犬の第3, 第4小臼歯歯胚の歯小嚢を外科的に採取して試料とした。乾燥重量 (mg), 水分含量 (%), ヒドロキシプロリン含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥量) からコラーゲン含有量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量), コンドロイチン-4-硫酸量からグリコサミノグリカン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量), さらにこの値からプロテオグリカン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量) の各週における変化を定量し、成長との関係を明らかにした¹⁵⁾。これらとは別に非コラーゲン性のタンパク質成分についても検索した。乾燥試料 (真空状態で五酸化リン使用) を0.5% SDS, 8M 尿素溶液を使用し、2.5mg/ml の割合で10分間煮沸後、可溶性画分に存在するタンパク質を SDS ゲル電気泳動で分画し、20種以上のタンパク質を同定した。このうち、血清由来でない分子量95kDa の糖タンパク質 (DF-95) は、14-16週で他のタンパク質バンドと比較して量的減少が著名であり、また、抽出試料を4°Cに保存すると、非コラーゲン性タンパク質量の低下を来すことから、これらの低下は共存するプロテアーゼの作用に基づくと考え、退縮するエナメル器のプロテアーゼが DF-95 やその他のタンパク質組成を歯の萌出時期と関連性を保ちながら分解する機構を仮説として提出した¹⁵⁾。

Gorski と Markes, Jr.¹⁶⁾はプロテアーゼが歯小嚢に存在する証明として、まず抗体を用いて酵素タンパク質の同定を行なった。先に述べた生後12, 16, 20週のイヌ小臼歯歯小嚢の試料を電気泳動後、

抗ヒトコラーゲナーゼ抗体と抗ヒトストロメライシン抗体を用い、イムノプロット法で検索した。分子量57kDa に相当する泳動位置に抗コラーゲナーゼと反応するバンドが確認され、このバンドは12週で最も強く、16週で低下し、20週では僅かに存在するだけであった。分子量55kDa のストロメライシンの抗体と反応するバンドは12, 16週で強い反応があり、20週では著名に低下した。これらの結果は12週で、小臼歯歯根の形成がはじまる前段階において両酵素のプロ型 (分子量から判断し) が存在することを証明するものであった。また、活性の存在を直接証明したものではないが、歯の成長状態における酵素タンパク質の量的変動を示唆するものであった。

次いで、活性型酵素の存在を証明するための実験を行なった。カゼインを基質として用い、加水分解活性部位を先に述べたエンザイモグラムによって同定する方法を用いた。この結果、12週と16週の歯小嚢試料で活性にもとづく透明バンドが同定でき、20週では僅かに同定が可能であった。カゼイン分解活性であることから、MMP-3 の前駆体が SDS 除去処理により活性化が起こった可能性を考慮した。しかし、前述した萌出に関与すると考えた DF-95 の糖タンパク質が直接作用を受けた証明はなされていない。

イヌの実験については、歯冠の形成が15週であり、エナメル器の退縮にともないプロテアーゼの前駆体が放出されると仮定するならば、比較的早い時期 (12週) に酵素の活性化がおきているにもかかわらず、DF-95 の分解が16週で起こる点 (in vivo で) では矛盾する。この点に関して、前駆型酵素の不在や DF-95 プロテアーゼ分布に局在性があるか、あるいは、活性酵素の分布を抑制する構造物に起因するのではないかと述べている。

2. マトリックスメタロプロティナーゼと歯胚の細胞外マトリックス成分

前述の MMPs は細胞外マトリックスの組成を分解するタンパク質分解酵素の総称で、正常な結合組織の発生・分化や傷創治癒にかかわっている点で重要性が指摘されている。一般的な性質として、中性 pH で活性を示し、最大活性を示すために、内在の Zn^{2+} の存在と Ca^{2+} の添加が要求される酵素である。このためキレート試薬で阻害を受けるが、セリン、システィン、アスパラギン酸が

活性発現に必要なプロテナーゼの阻害剤の影響を受けない、現在 MMP-1 から 7 迄の存在が証明されているが、先に述べた MMP-1 (間質コラーゲナーゼあるいは脊椎動物コラーゲナーゼ), MMP-2 (ゼラチナーゼ), MMP-3 (ストロメライシン, プロテオグリカナーゼ, プロコラーゲンアクチベーター)との3種は巾広く研究されている¹⁷⁾。

MMP-1 は間質コラーゲンに基質特異性を持ち、未変性の I, II, III型コラーゲンの三本鎖ヘリックス構造を単一な切断箇所-Gly-Ile (あるいは Leu) -間 (アミノ酸残基772-773) のペプチド結合を、アミノ末端から3/4の位置で切断する^{18,19)}。この酵素は各種組織抽出液中、組織や器官培養液中あるいは培養細胞で存在が知られているが、化学試薬、サイトカイン、成長因子などの合成刺激剤も数多く知られている¹⁷⁾。MMP-2 は変性したコラーゲン(I, II, III型)、通称ゼラチンに対して極めて高い特異性を示すため、ゼラチナーゼとも呼ばれている。また、細胞接着因子で

あるフィブロネクチン²⁰⁾や弾性線維であるエラスチン²¹⁾にも作用し-Pro-Glu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-ペプチドの Gly-Ile 間のペプチド結合を加水分解する。MMP-3 は巾広い基質特異性を示す。最初、軟骨プロテオグリカンの分解が報告された^{22,23)}。また基底膜の組成であるIV型コラーゲン²⁴⁾、ラミニンやフィブロネクチン²⁵⁾、さらにエラスチンやゼラチン²⁴⁾に対しても活性を示すことが明らかにされた。また、MMP-1 と同様、IL-1やEGFで合成の刺激が起こることが知られている¹⁷⁾。

3. 細胞外マトリックスの成分

上皮と間葉間の相互作用ともなる歯の形成過程を誘導する各種の決定因子(分子)が提出されているので、これらの生化学的性質について記載し、これら高分子の生合成と加水分解が歯胚の形態や歯の成長といかにかわっているか考察したい。

1) フィブロネクチン²⁶⁾ (Fibronectins)

Table 1: Distribution of some extracellular matrix components and cell surface molecules during tooth morphogenesis⁶⁾

Developmental stage	Fibronectin	Collagen III	Tenascin	Syndecan	EGF binding
Bud					
Dental epithelium	—	—	—	++	+++
Oral epithelium	—	—	—	+++	++
Dental mesenchyme	++	++	+++	+++	+
Surrounding mesenchyme	++	++	+	—	++
Cap					
Inner enamel epithelium	—	—	—	—	—
Outer enamel epithelium	—	—	—	+	+
Oral epithelium	—	—	—	+++	++
Dental mesenchyme	++	+	+	+++	+++
Surrounding mesenchyme	++	++	++	—	++
Early bell					
Dental epithelium	—	—	—	—	—
Oral epithelium	—	—	—	+++	++
Dental papilla	++	+	+	+	—
Dental follicle	+	+	—	+	++
Dental basement membrane	+++	+	+++	—	—
Late bell					
Ameloblasts	—	—	—	—	—
Oral epithelium	—	—	—	+++	++
Odontoblasts	—	—	—	—	—
Dental papilla (pulp)	+++	+++	+++	—	—
Dental follicle	++	+++	—	+	+++
Predentin	++	+	—	—	—
Dentin	—	—	—	—	—

フィブロネクチンは糖タンパク質に属する高分子で、細胞外マトリックスと血漿中に存在が知られている。細胞接着を促進し、細胞の形態形成運動、細胞分化、細胞骨格の組織化などに作用する。細胞表面のインテグリン受容体あるいは細胞外マトリックスに結合する構造的・機械的ドメインを形成する“くり返し単位”があり、コラーゲン、フィブリン、ヘパリン/ヘパラン硫酸、などと結合する。

Thesleff ら⁹⁾はマウス胚(13日、蕾状期;16日、鐘状期;出生後)におけるフィブロネクチンの分布をポリクロナル抗体を用いる免疫組織化学的方法で検討し、間葉と基底膜に強い反応があり、出生後象牙質には検出されないことを報告した(表1)。一方、Garbarch ら²⁷⁾はヒト胎児の切歯歯胚を材料とし4種のフィブロネクチンの抗体を使用して免疫組織化学的方法でフィブロネクチンの分布を検討した。抗体による反応性の相違があるも

の、基底膜にはいずれの抗体でも反応がみられ、象牙質とエナメル器には反応がなく、エナメル質は抗体によって相違があった(図1)。

フィブロネクチンは分化している間葉細胞が、基底膜にそって一例に並ぶ時に利用できる接着タンパク質である。歯乳頭細胞がインテグリンスーパーファミリーに属するフィブロネクチンの受容体を細胞表面に発現していることが証明されている。歯乳頭の細胞と基底膜間の相互作用にはフィブロネクチンが寄与し、象牙芽細胞の分極とトランスメンブランインテグリンタンパク質と細胞骨格素材を介して遺伝子発現を調節する役割を担っていると考えられている。

2) ラミニン²⁶⁾ (Laminin)

結合組織と上皮組織間の基底膜に存在する高分子糖タンパク質である。ラミニンは3種のサブユニットから形成されている。すなわち、400kDaのA鎖1本、200kDaのB鎖2本で十字型構造を形成

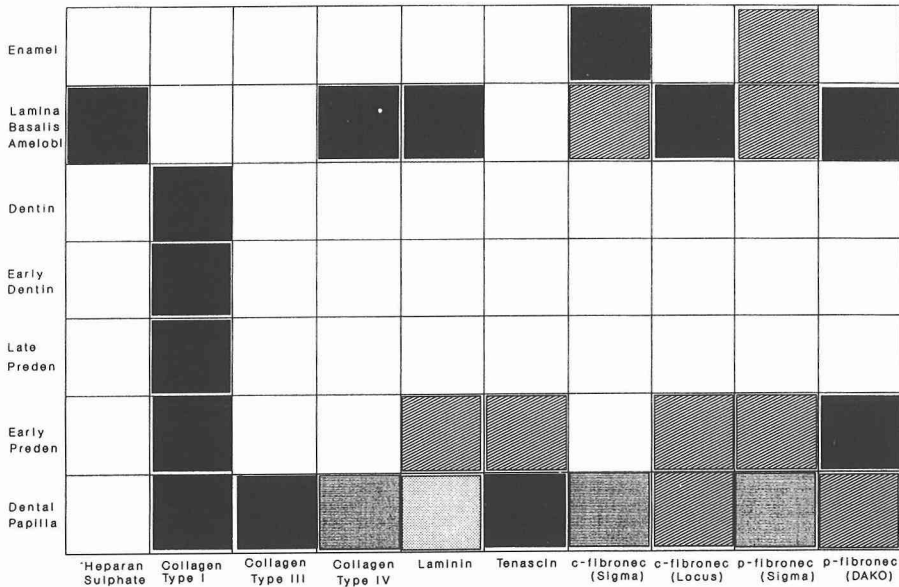


Fig 1 : The main features of the immunohistochemical localization of the intercellular matrix substances in the human tooth germ²⁷⁾:
 Black squares=intense reaction
 Hatched squares=weaker reaction
 Gray squares=reaction in vessels
 Light gray squares=weak reaction in vessels

し、A鎖のカルボキシ末端側1/3は球状構造をした領域である。

ラミニンは試験管内において、接着、拡散、移動(遊走)、分化、成長など、細胞に色々な影響を与えることが知られている。最も研究されたラミニンの生物活性は細胞接着と神経突起の形成促進であるが、インテグリンタイプの細胞表面レセプターとラミニンの相互作用の主要部位はA鎖の両末端と十字の中心付近に存在する。ラミニン分子間は Ca^{2+} 依存性の結合をするが、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、IV型コラーゲンを含む基底膜組成と同様な様式で相互作用する。

Garbarchら²⁷⁾の報告ではラミニンは内、外エナメル上皮の基底膜が抗体で強く染色されるが、基板の陽性反応が明瞭であった。また形成初期の象牙前質に弱い反応を観察している。

3) テネイシン²⁶⁾ (Tenascin)

テネイシンは分子量の大きい(190, 200, 230 kDa)サブユニットがジスルフィド結合し、6量体を形成している糖タンパク質である。分子中には上皮増殖因子に類似した領域、フィブロネクチンIII型領域のくり返し構造やフィブリノーゲンと均一性を持つ球状領域を有することが知られている。

生物学的作用は器官発育の過程で、上皮-間葉間の相互作用にかかわることが報告された²⁸⁾。まだ議論の余地があるが細胞の抗接着因子として働き、細胞を球状にする効果を示す^{29,30)}。一般には細胞接着と細胞形状を維持し、結果的に細胞分化に作用すると考えられている。

歯胚におけるテネイシンの分布に関するヒト胎児のGarbarchの報告²⁷⁾では、歯乳頭と象牙芽細胞間、形成初期の象牙前質では象牙細管にそって抗体染色で強い反応があるが、エナメル質では陰性であった。また基底膜には特に強い反応は観察されていないが、上皮の増殖の盛んな部位では上皮直下に線状の染色が観察されている。一方、Thesleffら⁶⁾の報告では、マウス歯胚の蓄状期には、増殖中の間葉と形成中の下顎骨に抗体で染色される陽性反応が観察された。鐘状期には歯小囊の反応は低下し、上皮では反応は陰性であるが、エナメル器の星状網細胞に陽性反応が観察された。出生後は歯小囊に反応がなく、象牙前質で弱い陽性反応が観察された。

4) シンデカン²⁶⁾ (Syndecan)

シンデカン分子中にヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸を持つプロテオグリカンで、細胞膜の構成要素である。細胞外部においては各種のマトリックス成分やbFGF (basic fibroblast growth factor)、ヘパリン結合成長因子、さらに細胞内部においてはアクチン細胞骨格と相互関係を持つ。上皮に多量存在し、胚の成長過程では誘導された間葉細胞に存在する。生物学的機能は上皮細胞の形状と組織化を調節し安定性に寄与するようである。マトリックス中のタンパク質との結合は、シンデカンと膜面の架橋を可能にし、アクチンが存在する細胞骨格と細胞質領域と会合する。細胞が浮遊した状態では、プロテアーゼの作用を受け易い膜外に出た領域での切断が起き、急速な除去($t_{1/2}=15\text{min}$)が起こり、浮遊状態では細胞表面にシンデカンは再発現しない³¹⁾。

層を形成している上皮では、シンデカンはすべての細胞表面をおおっており(~92kDa)、単一の上皮細胞では基底面の表面(~160kDa)に存在する。一方、間葉細胞においては、シンデカンは細

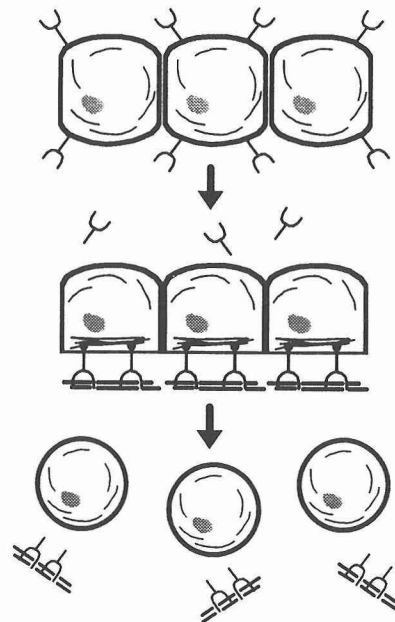


Fig 2 : Syndecan stabilizes epithelial cell sheets : Cells are linked together by cell adhesion molecules³³⁾.

胞内に多く存在する (300kDa)³²⁾. 分子量の相違は単位コアータンパク質当たりグリコサミノグリカン鎖の数と大きさの相違が原因であり, 多形現象が説明可能である. 上皮細胞層のシンデカンによる安定化の模式図が Bernfield と Sanderson³³⁾ (1990) によって提出されている (図 2). 膜の表面上シンデカンは移動性を示し, サブコンフルエントの培養細胞をとりまく状態を示す (図 2, 上段). コンフルエントの状態になるとシンデカンは細胞表面の基底面に分極し不溶性のマトリックスと結合する. マトリックスとシンデカンは膜の面で架橋し, その結果, アクチン細胞骨格と細胞内における会合を起し, 上皮細胞層を安定化する

(図 2, 中段). 細胞の形の変化はシンデカンの外部領域の分解を招来し, 細胞とマトリックス間の結合を破壊する (図 2, 下段). シンデカンのコアータンパク質のアミノ末端から 251 と 252 番目に存在するアルギニンとトリジンの結合はトリプシンなどで加水分解を受ける部位である.

マウス歯胚蓄状期における Thesleff らの報告⁶⁾では上皮細胞と増殖の盛んな間葉に局在している. 鐘状期では口腔上皮に強い反応があり, 歯小囊では弱い反応を示す程度である. 出生後には口腔上皮, エナメル器の中間層と星状網の細胞層に発現しているが, エナメル芽細胞層は陰性である. 歯頸部間葉の領域は反応が弱く, 咬頭部では陰性

Table 2: Distribution of the enzyme activity on tissue sections³⁴⁾

Enzyme	Arylaminopeptidases					
	ala 2-NA	arg 2-NA	leu 2-NA	lys 2-NA	met 2-NA	pro 2-NA
Initiation (Bud stage)						
Basal cells of oral epithelium	+	○	+	○	+	○
Subjacent mesoderm	+	○	+	○	+	○
Proliferation (Cap stage)						
Outer enamel epithellum	+	○	+	○	+	○
Inner enamel epithellum	+	○	+	○	+	○
Stellate reticulum	○	○	○	○	○	○
Dental papilla	+	○	+	○	+	○
Histodifferentiation (Bell stage)						
Outer enamel epithelium	+	○	+	○	+	○
Inner enamel epithelium	+	○	+	○	+	○
Stellate reticulum	○	○	○	○	○	○
Dental papilla	+	○	+	○	+	○
Dental lamina	+	○	+	○	+	○
Primordium of permanent tooth	+	○	+	○	+	○
Apposition						
Outer enamel epithelium	+	+	+	(+)	+	○
Inner enamel epithelium	○	○	○	○	○	○
Ameloblasts	○	○	○	○	○	○
Odontoblasts	○	○	○	○	○	○
Enamel	○	○	○	○	○	○
Dentin	○	○	○	○	○	○
Pulp	○	○	○	○	○	○
Dental lamina	+	+	+	(+)	+	○
Primordium of permanent tooth	+	+	+	(+)	+	○

++ Abundant enzyme activity in all sections

+ Enzyme activity in all sections

(+) Slight enzyme activity in some sections

○ No enzyme activity in any of the sections

であった。

III. 歯の形成とペプチダーゼ活性

ヒトの歯の発生過程における細胞分化や組織中で起きているタンパク質代謝を研究するため、アリアルミノペプチダーゼとグリコシダーゼ活性の組織化学的検討が行なわれた³⁴⁾。アリアルミノペプチダーゼ活性は口腔上皮の基底細胞層、隣接する中胚葉、内エナメル上皮、外エナメル上皮、歯乳頭、歯堤、永久歯原基などで陽性を示したが、エナメル質、象牙質、歯髄などには活性が認められていない(表2)。すなわち、細胞分化が活発な時にペプチド代謝活性が高いという予想を支持する結果であった。

サルとラットの歯の形成期におけるロイシンアミノペプチダーゼ活性を組織化学的に行ない、動物種による活性分布の相違を比較報告した³⁵⁾。

口腔諸組織のPZ-ペプチダーゼとグリシルプロリルβ-ナフチルアミダーゼ活性を合成基質を用いて測定した報告³⁶⁾では、乳歯歯根の吸収部の歯小嚢にこれらの酵素活性が高く、コラーゲン分解活性の高い状態を反映しているものと推定した。同様に歯胚や歯髄におけるコラーゲン分解の

結果生成すると考えられるプロリン含有ペプチドに作用するペプチダーゼ活性をウシ歯胚エナメル器を含む歯小嚢と歯髄中で測定した結果、両者でトリペプチドアミノペプチダーゼ活性が最も高い値を示した(表3)³⁷⁾。このため本酵素を精製し、その性質を検討した結果、活性発現に-SH基が関与し、ベスタチンで阻害されることがわかった³⁸⁾。一方、歯胚における歯の形成とジペプチルジペプチダーゼIV(DPPIV)プロリルオリゴペプチダーゼ(POP)、X-プロリン(X-Pro)ジペプチダーゼ活性についてブタ永久歯歯胚のエナメル器と歯乳頭で比較した結果³⁹⁾は表4に示すごとくであった。すなわち歯の形成が最も進んでいるM₂のエナメル器においてDPP IV活性が最も高く、咬頭部の形成がはじまったばかりのM₃ではこの活性が低い結果であった。また、DPP IV活性はエナメル器で高いが、POP活性は歯乳頭で高く、X-Proジペプチダーゼ活性は両者で相違を示さなかった。プロリン含有ペプチドに作用する酵素の活性に両者で相違が見られるため、プロテアーゼ活性の存在を証明する必要がある。この点に関し筆者は、ゼラチンを基質とするエンザイモグラフにより、エナメル器、歯乳頭中ゼラチン分解活性の存在を証明

Table 3 : Peptidase activities towards proline-containing peptides in developing bovine dental tissues (means±SD for four determinations)³⁷⁾

Enzymes	Susceptible bond of substrate	Activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ protein)	
		Dental follicle	Dental pulp
Tripeptide aminopeptidase	Pro-Gly-Gly	81.4±10.7	68.7±7.2
Proline iminopeptidase	Pro-Leu-Gly-NH ₂	4.8±1.4	6.0±1.1
Aminopeptidase P	Gly-Pro-Hyp	NA	NA
Prolyl dipeptidase	Pro-Ala	7.57±0.42	0.96±0.28
Proline dipeptidase	Gly-Pro	29.7±7.2	28.4±4.4
Dipeptidyl peptidase IV	Gly-Pro-Ala	5.55±0.64	1.65±0.35
Prolyl endopeptidase	Cbz-Gly-Pro-βNA	0.48±0.18	0.38±0.02
Leucyl β-naphthylamide hydrolase	Leu-βNA	1.53±0.32	1.32±0.35

NA, No activity was observed with this substrate.

Table 4 : Dipeptidyl peptidase IV activity, prolyl oligopeptidase activity, and X-Pro dipeptidase activity in pig dental germs³⁹⁾

Dental germs	Sample number	Dipeptidyl peptidase IV activity (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)		Prolyl oligopeptidase activity (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)		X-Pro dipeptidase activity (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	
		Enamel organ	Dental papilla	Enamel organ	Dental papilla	Enamel organ	Dental papilla
M3	1	3.6	2.3	—	—	—	—
	2	2.8	1.0	2.5	5.9	9.2	15.0
	3	3.4	1.9	2.9	5.1	16.7	18.8
	4	3.7	1.8	1.9	3.1	11.8	11.9
	mean±SD	3.4±0.4	1.8±0.5	2.4±0.5	4.7±1.4	12.6±3.8	15.2±3.5
M2	1	6.2	2.0	0.6	1.5	—	—
	2	5.7	1.8	2.0	4.2	19.5	19.6
	3	8.9	1.4	2.1	3.6	17.9	19.5
	4	8.7	0.7	1.0	1.7	14.3	20.0
	mean±SD	7.4±1.7	1.5±0.6	1.4±0.7	2.8±1.4	17.2±2.7	19.7±0.3
P	1	5.0	2.0	—	—	—	—
	2	4.2	3.0	1.6	3.6	13.9	19.7
	3	3.8	1.6	0.6	3.3	9.8	13.4
	4	6.2	0.8	0.9	2.0	8.6	13.9
	mean±SD	4.8±1.1	1.9±1.0	1.0±0.5	3.0±0.9	10.8±2.8	15.7±3.5

— not determined

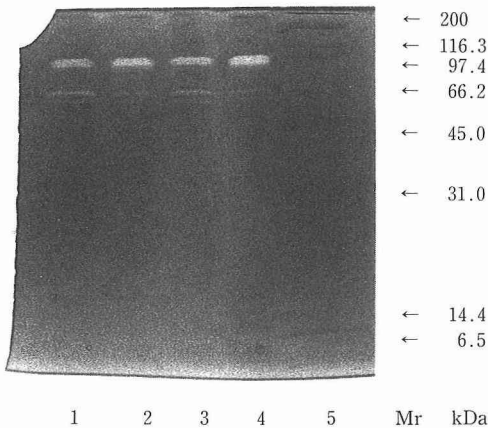


Fig 3 : Identification of proteinases in pig permanent germs by enzymography⁴⁰⁾ :

- Lane 1 M₃ enamel organ
- Lane 2 M₃ dental papilla
- Lane 3 M₂ enamel organ
- Lane 4 M₂ dental papilla
- Lane 5 Molecular mass weight standards

Upper negative staining bands indicate gelatinolytic activity in the absence of calcium.
Lower negative staining bands indicate calcium activated gelatinolytic activity.

した(図3)⁴⁰⁾。

一方、ヒト歯髄にDPP IV活性を組織化学的に観察し、線維芽細胞様細胞と象牙芽細胞表面のDPP IV活性はフィブロネクチン由来のコラーゲン接着に基づく可能性を示すが、内皮細胞膜に結合した活性と無髄神経シュワン細胞の活性は、生物活性を示すニューロペプチド(サブスタンスP)の分解に寄与する可能性を示唆した⁴¹⁾。

歯胚における歯の形成過程に、上皮-間葉組織間の相互作用に関与する各種マトリックス成分の合成・分解にともなう消長や各種サイトカインによるマトリックス成分の誘導と作用後の分解作用などに各種プロテアーゼがかかわっている可能性を概説した。

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) Thesleff, I. and Hurmerinta, K. (1981) Tissue interactions in tooth development. Differentiation, 18: 75-88.
- 2) Ruch, J. V., Lesot, H., Karcher-Djuricic, Meyer,

- J. M. and Mark, M. (1983) Epithelial-mesenchymal interactions in tooth germs: Mechanisms of differentiation. *J. Biol. Buccale*, **11**: 173—193.
- 3) Suga, S. (1970) Histochemical observation of proteolytic enzyme activity in the developing dental hard tissues of the rat. *Archs. oral Biol.* **15**: 555—558.
- 4) Ten Cate, A. R. (1989) *Oral Histology Development, Structure, and Function*, 3rd ed., 197—212. The C. V. Mosby Company, St. Louis Missouri.
- 5) Slavkin, H. C. (1991) Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: A review. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **11**: 338—349
- 6) Thesleff, I., Partanen, A-M. and Vanio, S. (1991) Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: The roles of extracellular matrix, growth factor, and cell surface receptors. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **11**: 229—237.
- 7) 原田 実 (1988) エナメルタンパク質—アミノグレンとエナメルリンの生化学. *松本歯学*, **14**: 139—153.
- 8) Fukae, M., Tanabe, T. and Shimizu, M. (1977) Proteolytic enzyme activity in porcine immature enamel. *Tsurumi U. Dent. J.* **3**: 15—17.
- 9) Shimizu, M., Tanabe, T. and Fukae, M. (1979) Proteolytic enzyme in porcine immature enamel. *J. Dent. Res.* **58** (B): 782—789.
- 10) Carter, J., Smillie, A. C. and Shepherd, M. G. (1989) Purification and properties of a protease from developing porcine dental enamel. *Archs. oral Biol.* **34**: 195—202.
- 11) Overall, C. M. and Limeback, H. (1988) Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem. J.* **256**: 965—972.
- 12) DenBesten, P. K. and Heffernan, L. M. (1989) Separation by polyacrylamide gel electrophoresis of multiple proteases in rat and bovine enamel. *Archs. oral Biol.* **34**: 399—404.
- 13) Marks, S. C. Jr. and Cahill, D. R. (1984) Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Archs. oral Biol.* **29**: 311—322.
- 14) Gorski, J. P., Marks, S. C. Jr., Cahill, D. R. and Weis, G. E. (1988) Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. *Conn. Tiss. Res.* **18**: 175—190.
- 15) Gorski, J. P., Marks, S. C. Jr., Cahill, D. R. and Wise, G. E. (1988) Biochemical analysis of the extracellular matrix of the dental follicle at different stages of tooth eruption. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption* Ed. Davidovitch, Z. EBSCO Media, Birmingham, AL 35233: 251—260.
- 16) Gorski, J. P. and Marks, S. C. Jr. (1992) Current concepts of the biology of tooth eruption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **3**: 185—206.
- 17) Emonard, H. and Grimand, J-A. (1990) Matrix metalloproteinases. A Review. *Cell. Mol. Biol.* **36**: 131—153.
- 18) Miller, E. J., Hawis, E. D., Jr., Chung, E., Finch, J. E. Jr., McCroskery, P. A. and Butler, W. T. (1976) Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the NH₂-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry*, **15**: 787—792.
- 19) Fields, G. B., Van Wart, H.E. and Birkedal-Hansen, H. (1987) Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. Evidence for the role of collagen structure in determining the collagenase cleavage site. *J. Biol. Chem.* **262**: 6221—6226.
- 20) Collier, I. E. Wilhelm, S. E., Eisen, A. Z., Marmor, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A. and Goldberg, G. I. (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **263**: 6579—6587.
- 21) Murphy, G., Ward, R., Hembry, R. M., Reynolds, J. J., Kuhn, K. and Tryggvason, K. (1989) Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumor type IV collagenase. *Biochem. J.* **258**: 463—472.
- 22) Sellers, A., Reynolds, J. J. and Meikle, M. C. (1978) Neutral metalloproteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem. J.* **171**: 493—496.
- 23) Vaes, G., Beckhout, Y., Lenaers-Claeys, G., Francois-Gillet, C. and Druetz, J.-E. (1978) The simultaneous release by bone explants in culture and the parallel activation of procollagenase and of a latent neutral proteinase that degrades cartilage proteoglycans and denatur-

- ed collagen. *Biochem. J.* **172**: 261—274.
- 24) Chin, J. R., Murphy, G. and Werb, Z. (1985) Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J. Biol. Chem.* **260**: 12367—12376.
- 25) Murphy, G., Cawston, T. E., Galloway, W. A., Barnes, M. J., Bunning, R. A. D., Mercer, E., Reynolds, J. J. and Burgeson, R. E. (1981) Metalloproteinases from rabbit bone culture medium degrade types IV and V collagens, laminin and fibronectin. *Biochem. J.* **199**: 807—811.
- 26) Kreis, T. and Vale, R. ed. (1993) *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- 27) Garbarch, C., Matthiessen, M. E., Olsen, B. E., Moe, D. and Kirkeby, S. (1994) Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. *Histochem. J.* **26**: 110—118.
- 28) Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E. J., Pearson, C. A. and Sakakura, T. (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*, **47**: 131—139.
- 29) Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K. and Chiquet, M. (1988) Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell*, **53**: 383—390.
- 30) Lotz, M. M., Burdsal, C. A., Erickson, H. P. and McClay, D. R. (1989) Cell adhesion to fibronectin and tenascin: Quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J. Cell Biol.* **109**: 1795—1805.
- 31) Jalkanen, M., Rapraeger, A., Saunders, S. and Bernfield, M. (1987) Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J. Cell Biol.* **105**: 3087—3096.
- 32) Kato, M. and Bernfield, M. (1989) Polymorphism of syndecan: A distinctive form on mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **109**: 320a.
- 33) Bernfield, M. and Sanderson, R. D. (1990) Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos. Trans. R. Soc. (London)*. **B327**: 171—186.
- 34) Larmas, L. and Larmas, M. (1974) A histochemical study of hydrolytic enzymes in human tooth ontogeny. *J. Periodont.* **9**: 29—38.
- 35) Hasselgren, G. and Hammarstrom, L. E. (1976) Species differences in L-leucinaminopeptidase activity during tooth formation in the macaque monkey and rat. *Archs. oral Biol.* **20**: 19—22.
- 36) Hino, M., Nakano, G., Harada, M. and Nagatsu, T. (1975) Distribution of PZ-peptidase and glycyloprolyl β -naphthylamidase activities in oral tissues. *Archs. Oral Biol.* **20**: 19—22.
- 37) Harada, M., Hiraoka, B. Y., Fukasawa, K., Fukasawa, K. M., Takagi, T. and Sasaki, S. (1991) Peptidase activities in bovine dental follicle and pulp towards proline-containing peptides. *Med. Sci. Res.* **19**: 773—775.
- 38) Hiraoka, B. Y. and Harada, M. (1993) Purification and characterization of tripeptide aminopeptidase from bovine dental follicles. *Mol. Cell. Biochem.* **129**: 87—92.
- 39) Harada, M. (1994) Comparison of dipeptidyl peptidase IV and prolyl oligopeptidase activities in the pig permanent tooth germ during tooth development. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants*. Davidovitch, Z. Ed. EBSCO Media, Birmingham, AL3523 印刷中
- 40) 原田 実(1994)ブタ永久歯歯胚中のプロティナーゼ活性のエンザイモグラムによる同定. *歯基礎誌*, **36** (抄録集): 189.
- 41) Dubovy, P. and Kukletova, M. (1992) A histochemical study by light and electron microscopy of the distribution of dipeptidyl peptidase IV activity in the human dental pulp. *Archs. oral. Biol.* **37**: 1—6.