原 著

差分化遺伝子クローニングによる骨芽細胞への低出力 レーザー照射の生物学的効果の機序解明

安 孫 子 宜 光

日本大学松戸歯学部生化学講座

(主任 : 安孫子宜光教授)

(受理 : 平成 14 年 7 月 15 日)

Elucidation of Mechanisms for the Biostimulatory Effect of Low Level Laser Irradiation on Osteoblasts by Subtractive Gene Cloning

Yoshimitsu ABIKO

Department of Biochemistry and Oral Science Research Institute,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Chief : Prof. Yoshimitsu ABIKO)

(Accepted for Publication : July 15, 2002)

Abstract : Various biostimulatory effects of low-energy laser irradiation (LLLI) have been reported that involve the acceleration of bone regeneration. We reported that LLLI stimulated cellular proliferation, bone nodule formation, alkaline phosphatase activity, and osteocalcin expression. However, the molecular basis of the mechanisms leading to these findings has not been elucidated. To accomplish this, we constructed the cDNA library of MC3T3-E1, a clonal osteoblastic cell line, which enhanced gene expressions by LLLI using a subtracted gene cloning procedure. In the present study, we further characterized gene library by DNA nucleotide sequence and homology-search with a DNA database. Among 88 subtractive genes, several clones exhibited high homology with mitochondrial protein genes, signal transduction-related genes, and EST genes. These findings may help to elucidate the molecular-based mechanisms for the biostimulatory effect of LLLI on osteoblasts.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 13 : 79~88, 2002 Reprint requests to Dr. ABIKO)

Key words=Low-energy laser irradiation, Osteoblast, Gene expression

キーワード=低出力レーザー, 骨芽細胞, 遺伝子発現

緒 言

低出力レーザー照射が創傷や難治性潰瘍に治癒効果があると言及されて以来, 炎症抑制, 疼痛減少, 骨折治癒促進など広範な臨床効果が報告されている^{1,2)}。しかしながら,

低出力レーザー照射による生物学的効果の作用機序は不明な点が多い。とくに分子レベルでの実証科学的な解明は遅れている。

歯科医学領域にも積極的な応用が期待されているなかで, レーザー医療をさらに推進, 発展させるためには, 有用性

の高いレーザー照射の機種、照射法を開発するとともに、生物学的効果を実証科学的に解明していく必要があると思われる。

従来の分子レベルでの研究アプローチは、生理活性物質の発見→精製→遺伝子クローニング→機能解析→タンパク質一次構造の解析が行われてきた。しかし、これらの研究方法では、すでによく知られている生理活性物質あるいは同定、精製に成功した分子しか捉えることはできない。当然ながら、目的とする生命現象に関わる未知の遺伝子については研究することは不可能である。

近年、ゲノムサイエンス研究の飛躍的な進展に伴い、ヒトを含む種々の生物のゲノム計画が進められている³⁾。ゲノムデータベースの充実に伴って、細胞内で変動する遺伝子のトランスクリプトーム解析は、生命現象を理解することに多くの情報を与え得ると期待されている。

遺伝子発現の変動を捉える方法として、遺伝子バンクを作成し、対照の mRNA で差し引きするサブトラクション遺伝子クローニング法が開発されている⁴⁾。レーザー照射した細胞から mRNA を分離して cDNA 遺伝子バンクを調製し、非レーザー照射細胞の mRNA を用いて同一の遺伝子を差し引いた（差分化）残りの遺伝子群は、レーザー照射によって遺伝子発現が増大した遺伝子ということになる。この差分化遺伝子ライブラリーを作成し、得られた遺伝子クローンの塩基配列を解読してゲノムデータベースの遺伝子配列とホモロジー検索することによって関与する遺伝子を同定し、その遺伝子の遺伝子産物の機能を明らかにすることが可能となる。

本研究では、骨芽細胞に低出力レーザー照射して差分化遺伝子ライブラリーを構築して新たに得た 88 遺伝子クローンについて塩基配列を解読し、低出力レーザー照射の生物学的効果の作用機序の解明を試みた。

実験方法

1. 細胞培養

骨芽細胞として、マウス新生仔の頭蓋骨から樹立され、骨結節形成能を有する MC3T3-E1⁵⁾を用いた。細胞は、10% 牛胎児血清、100 μ g/ml ペニシリン G、50 μ g/ml ゲンタマイシン硫酸を添加した α -MEM 培地で、95% air-5% CO₂、37℃ の条件化、CO₂ インキュベーターで培養した。培養ディッシュ (75cm²) に培養液 10ml の培養液を加えて培養を行った。

2. レーザー装置

低出力レーザー照射装置は、Ga-Al-As 半導体レーザー装置（モデル Panalas-1000、波長 830nm、最大出力 500 mW；松下電器）を用いた。細胞表面から 5 cm の距離に

照射部を設定し、500mW で培養ディッシュ 75cm² に対して 20 分間照射した。この照射条件で、エネルギー密度は 7.6 J/cm² になる。培養液の存在下および非存在化でレーザー照射を行って調べたところ、両条件でのエネルギー量に差は認められなかった。このことから培養液中の赤色物質による吸収は軽微と考えられ、照射時に培養液を取り除かず実験を行った。また、この照射条件で培養液の温度の変化に有意差は認められない。

3. cDNA ライブラリーの作成

本実験では、細胞増殖への影響も調べるために、MC3T3-E1 細胞をセミコンフルエントまで培養し、レーザー照射後、1, 6, 12, 24 時間後に細胞から総 RNA を回収した。総 RNA を混合して、mRNA を精製し、cDNA ライブラリーを作成した。5 μ g のポリ A-RNA をテンプレートにして、1.6 μ g Not I サイトをもつ oligo dT をプライマーに、メチル化デオキシヌクレオチドを用いて逆転写酵素 (Superscript II) 反応によって cDNA を合成した。合成試料から RNA を RNase H を用いて取り除いた後、BglII-Sma I アダプターを付加してベクタープラスミドに一方向で挿入できるようにした。300bp 以下の短い DNA フラグメントをスピンカラムで除き、ベクタープラスミド pAPneo に挿入し、T4 リガーゼでキメラプラスミドを作成した⁶⁾ (図 1)。

4. 差分化遺伝子クローニング

キメラプラスミドを宿主細胞 *Escherichia coli* DH5 α F7IQ にエレクトロポレーション法で形質転換し、R408 ファージを感染させて一本鎖化して回収した。次いで、レーザー非照射 MC3T3-E1 から回収、精製した mRNA をビオチン標識し、一本鎖化キメラプラスミド ライブラリーとハイブリダイズさせ、さらにストレプトアビジンを結合させた。共通する mRNA 結合キメラプラスミドをフェノール法で除去し、残ったキメラプラスミド、すなわちレーザー照射で mRNA レベルが上昇した遺伝子を含むキメラプラスミドを回収した。この操作を二度繰り返した。差分化キメラプラスミドに BcaBEST DNA ポリメラーゼを用いて二本鎖 DNA プラスミドにした後、*E. coli* MC1061A に形質転換して差分化遺伝子クローン ライブラリーを作成した⁶⁾ (図 2)。

5. 塩基配列の解読

単一コロニーの *E. coli* 遺伝子クローンをランダムに回収後、自動プラスミド精製装置 (Kurabo, PI-100) でプラスミドを回収、精製した。各キメラプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列の解読は、dideoxy chain termination 法⁷⁾で行った。塩基配列の解読は蛍光自動 DNA シーケンサー (LiCor, Epicenter Technolgy 社)、蛍光標識

図 1 非レーザー照射細胞遺伝子バンク作成の概略

制限酵素リンカー付加の工夫によって cDNA 断片の挿入方向は一定となり、分化する際非レーザー照射細胞 mRNA に対するアンチセンス鎖がプラスミド DNA の一本鎖として残る。

図 2 差別化遺伝子ライブラリー作成の概略
プラスミド遺伝子バンクの一本鎖化された DNA にビオチン標識した非レーザー照射細胞 mRNA が結合する。ビオチンにストレプトアビジンが結合したプラスミドはフェノール処理で取り除かれる。上清画分に残ったプラスミド DNA を二本鎖に戻して大腸菌宿主に形質転換して差別化遺伝子ライブラリーを得る。

DNA プライマー, Sequi therm Long-Read cycle sequencing kit (LiCor, Epicenter Technolgy 社) を用いて行った。

6. データベース検索

National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を利用して、塩基配列のホモロジー検索 (Nucleotide BLAST; blastn) を行った。約 520bp の塩基配列のホモロジー検索の結果で既知遺伝子と一部の相同性が見られたものを Known gene クローン, アノテーションがない EST (Expression Sequence Tag) gene とのホモロジーが見られたものを EST クローン, 30bp 以上相同性が見られないのを Unknown gene クローンとした。

結 果

差分化遺伝子ライブラリーからプラスミド DNA を抽出, 精製し制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動を行い, 挿入断片を調べた。図 3 にその一部を示す。

300bp 以上の挿入断片をもち, かつ制限酵素消化パターンが異なる 88 遺伝子クローンを選び, プラスミド DNA を精製し, それぞれの挿入 DNA 断片の塩基配列について 520bp 解読した。得られた塩基配列情報を NCBI の BLAST プログラムで塩基配列のホモロジー検索を行った。図 4 は, No. 1-178 クローンを一例として示したもので, 図 4A が塩基配列, 図 4B が DNA データベースとのホモロジー検索で相同性のあった遺伝子とのアライメントスコア, 図 4C がホモロジー検索で相同性の極めて高いトップ 4 遺伝子のアノテーション情報である。そして, 図 4D は, No. 1-178 の塩基配列 (Query) と NM02553.1 遺伝子 (Sbjct) の DNA 塩基配列ホモロジー検索結果である。相同性の高かった 4 遺伝子のアノテーションは, いずれもマウスのミトコンドリアのリボゾームタンパク質 L11 であった。

88 遺伝子クローンについてのホモロジー検索の結果を表 1 にまとめた。22 クローンが Known 遺伝子, 38 クローンは EST クローン, 30 クローンは Unknown 遺伝子であった。また, 表 2 に 22 クローンの既知遺伝子についてのアノテーション情報を示した。

考 察

低出力レーザー照射の生物学的効果として, 炎症抑制, 疼痛減少, 創傷治癒促進, 骨折治癒促進などが報告されている。しかしながら, 一方ではレーザー照射の効果について心理的なプラセボ効果が大きいとする懐疑的な見方や単なる温度上昇効果によるものであるとする意見もある。

図 3 差分化遺伝子クローンのスクリーニング
差分化遺伝子ライブラリーの大腸菌クローンを培養し, 集菌後, プラスミド DNA を分離する。制限酵素 *Not* I, *Bgl* II で切断し, アガロース電気泳動を行う。300bp 以上の挿入 DNA をもつクローンを選択する。S, サイズスタンダード DNA; V, ベクタープラスミド DNA 断片

このような背景のなかで, 歯科領域への低出力レーザーの積極的な応用をさらに推進, 発展させるためには実証科学的方法で作用メカニズムを解明する基礎研究が必要であると考えられる。

われわれは, レーザー照射の骨形成促進メカニズムを解明するために *in vitro* 実験系を設定し検討を行っている。ラット胎仔の頭蓋骨から採取した骨芽細胞に低出力レーザー照射を行い, 骨結節数が照射量に比例して増大し, アルカリホスファターゼ活性, コラーゲン産生が促進されることを見いだしている⁸⁾。さらに, 培養早期のレーザー照射がより強い骨形成促進効果を有することを報告している⁹⁾。この結果は, レーザー照射が未分化間葉系細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進することを示唆する。

近年, ゲノム科学を基盤とする研究技術が進展し, ゲノム情報をすべて解読するゲノムプロジェクトの進展とその応用によって先進的な研究が行われている。細胞・組織から mRNA を抽出して, ランダムプライマーを用いて mRNA の遺伝子増幅を行って遺伝子発現レベルの差を同定するデファレンシャル ディスプレイ法や遺伝子バンクを作成して対照の mRNA で差し引くサブトラクション遺伝子クローニング法などが開発されている。そして, 得られた遺伝子の塩基配列情報をゲノムデータベースと照合することで, その生命現象に関与する遺伝子発現を未知遺伝子も含めて同定することが可能である。

A 塩基配列

TACATCATGTCCAAGCTAAGCCGGGCCACTCGGACCCTCAAGAAGCCCGAGGCCGGCGGTGATCCGGTCCATCG
 TGCGAGCAGGCCAAGCTATTCTGGGCCTCCACTAGGTCCCATCTTGGGTCAGCGAGGTGTCTCTATCAACCAGTT
 CTGCAAAGAGTTCAACGAGAAGACAAAGGACATCAAAGAAGGCATTCCCCTGCCTACAAAAATTTTATAAAGCCC
 GACAGGACATTTGAGCTCAAGATTGGGCAGCCCACTGTTTCTTACTTTTTGAAGGCAGCTGCTGGGATCGAGAAGG
 GGGCCCGGCATACAGGGAAAGAGGTGGCAGGCCTGGTGAGTTTGAAGCACGTATATGAGATTGCCTGTGTCAAAGC
 TAAGGATGATGCTTTTACCATGCAAGATGTGCCCTGTCTTCTGTGGTCCGTTCCATCATTGGCTCTGCCCGTTCC
 CTGGGCATTTCGAGTGGTGAAGGACCTCAGTGCAGAAGAACTGGAGGCTTTCAGAAGGAACGAG

B ホモロジー検索でヒットした遺伝子 **C ホモロジーの高い4遺伝子のアノテーション**

(1) gil13384979|ref|NM_025553.1|

Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(2) gil12845690|dbj|AK010329.1|AK010329

Mus musculus ES cells, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(3) gil12833044|dbj|AK002797.1|AK002797

Mus musculus kidney, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(4) gil13559368|dbj|AB049639.1|AB049639

Mus musculus MRPL11, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

D 塩基配列のホモロジー

(1) gi|13384979|ref|NM_025553.1

```
Query: 1 tacatcatgtccaagctaagccgggccactcggaccctcaagaagcccgaggccggcggc 60
      |||
Sbjct: 74 tacatcatgtccaagctaagccgggccactcggaccctcaagaagcccgaggccggcggc 133

Query: 61 gtgatccggtccatcgtgcgagcaggccaagctattcctgggcctccactaggtcccatc 120
      |||
Sbjct: 134 gtgatccggtccatcgtgcgagcaggccaagctattcctgggcctccactaggtcccatc 193

Query: 121 ttgggtcagcgagggtgtctctatcaaccagttctgcaaagagttcaacgagaagacaaag 180
      |||
Sbjct: 194 ttgggtcagcgagggtgtctctatcaaccagttctgcaaagagttcaacgagaagacaaag 253

Query: 181 gacatcaaagaaggcattcccctgcctacaaaaatttttataaagcccgacaggacattt 240
      |||
Sbjct: 254 gacatcaaagaaggcattcccctgcctacaaaaatttttataaagcccgacaggacattt 313

Query: 241 gagctcaagattgggcagcccactgtttcttactttttgaaggcagctgctgggatcgag 300
      |||
Sbjct: 314 gagctcaagattgggcagcccactgtttcttactttttgaaggcagctgctgggatcgag 373

Query: 301 aagggggcccgcatcacagggaagaggtggcaggcctggtgagtttgaagcacgtatat 360
      |||
Sbjct: 374 aagggggcccgcatcacagggaagaggtggcaggcctggtgagtttgaagcacgtatat 433

Query: 361 gagattgcctgtgtcaaagctaaggatgatgcttttaccatgcaagatgtgcccctgtct 420
      |||
Sbjct: 434 gagattgcctgtgtcaaagctaaggatgatgcttttgcctgcaagatgtgcccctgtct 493

Query: 421 tctgtggtccgttccatcattggctctgcccggtccctgggcattcgagtgggaaggac 480
      |||
Sbjct: 494 tctgtggtccgttccatcattggctctgcccggtccctgggcattcgagtgggaaggac 553

Query: 481 ctcagtgcagaagaactggaggctttccagaaggaacgag 520
      |||
Sbjct: 554 ctcagtgcagaagaactggaggctttccagaaggaacgag 593
```

図 4 差分化遺伝子クローンのホモロジー検索の一例

1-178 と名付けた差分化遺伝子クローンの塩基配列を NCBI の BLAST サーチを行った結果、マウスのミトコンドリアのリボソームタンパク質 L11 遺伝子と高い相同性が得られた。A, No. 1-178 クローンの塩基配列解読結果: B, BLAST 解析した結果のホモロジーをもつ遺伝子のアライメント結果: C, 相同性の極めて高いトップ4 遺伝子のアノテーション情報 D, 塩基性配列のホモロジー情報

表 1 88 遺伝子クローンのホモロジー検索結果

Unknown	EST	Known
1-87	1-79	332/332 (100%) 1-81 /32kDa
1-93	1-83	129/130 (99%) 1-84 /Thiord reductase
1-97	1-102	35/37 (94%) 1-85 /Myosin
1-100	1-112	291/306 (95%) 1-95 /TF
1-109	1-114	30/31 (96%) 1-104 /ESNRA
1-113	1-116	71/76 (93%) 1-122 /Msx Zn finger
1-121	1-125	239/254 (94%) 1-126 /sn RNA
1-143	1-127	54/54 (100%) 1-133 /galactin
1-149	1-128	297/300 (99%) 1-155 /c-jun
1-152	1-131	509/512 (99%) 1-164 /hydrolase
1-160	1-132	431/442 (97%) 1-167 /Centromere
1-163	1-136	199/218 (91%) 1-174 /Annexin III
1-165	1-147	233/251 (92%) 1-178 /Mt rRNA protein
1-168	1-150	237/240 (98%) 1-191 /hydrolase
1-169	1-151	494/516 (95%) 1-198 /EST/MHC
1-171	1-157	181/192 (94%) 1-199 /G protein
1-172	1-161	507/521 (97%) 2p-12 /phosphatase
1-173	1-162	156/171 (91%) 2p-16 /GDP/disof.
1-180	1-176	518/518 (100%) 2b-59 /Tyr-phosphatase
1-182	1-177	487/494 (98%) 2b-46 /silence Med-EST
1-183	1-194	519/520 (99%)
1-187	1-195	473/473 (100%)
1-192	1-197	413/420 (98%)
2b-45	2b-51	82/82 (100%)
2b-47	2b-52	418/466 (89%)
2b-50	2b-54	520/520 (100%)
2b-55	2b-56	83/85 (97%)
2b-57	2b-58	410/453 (90%)
2b-58	2p-1	516/518 (99%)
2p-20	2p-2	517/517 (100%)
	2p-6	517/518 (99%)
	2p-7	182/191 (95%)
	2p-8	516/517 (99%)
	2p-10	127/134 (94%)
	2p-11	509/516 (98%)
	2p-13	418/425 (98%)
	2p-18	301/304 (99%)
	2p-19	515/515 (100%)
30 clones	38 clones	20 clones

表 2 22-Known クローンの既知遺伝子のアノテーション情報

Gene ID No.	Description	Identities
AB049639	Mus musculus MRPL 11 mRNA for mitochondrial ribosomal protein L11	515/516 (99%)
AA285552	Mus musculus GDP-dissociation inhibitor	513/518 (99%)
AJ001633	Mus musculus mRNA for annexin III	513/517 (99%)
AI006497	Human protein phosphatase PP2A, 65kD regulatory subunit	511/518 (98%)
AF039567	Mus musculus Msx-interacting-zinc finger protein 1 (Miz1)	492/494 (99%)
AF112439	Mus musculus Fanconi anemia group G protein	465/472 (98%)
AA856395	Mus musculus Hypotical 32.8kD prtein in PDE1-CSE1 interigenic region	363/375 (96%)
BF714528	Mus musculus SnRNA activating protein 50kD subunit	352/408 (86%)
AF116187	Mus musculus inner centromere protein	278/296 (93%)
AF218069	Mus musculus galectin-8	267/270 (98%)
BE334277	Mus musculus c-jun protein oncogene	259/263 (98%)
AF230356	Mus musculus U2 small nuclear ribonucleoprotein A	240/258 (93%)
U28807	Mus musculus lymphoid-specific transcription factor NFATc3	239/244 (97%)
AF110520	Mus musculus major histocompatibility complex NG27, 28, RPS28	190/194 (97%)
BF730197	Human Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	158/170 (92%)
AF013490	Mus musculus protein-tyrosine phosphatase	128/133 (96%)
BC006075	Mus musculus Myosin, heavy polypeptide 9	121/134 (90%)
AA166294	Mus musculus Silencing mediator of retinoid & thyroid action	71/ 72 (98%)
AA611370	Mus musculus Bleomycin hydrolase	60/ 61 (98%)
AW743450	Mus musculus Thioredoxin-dependent peroxide reductase	46/ 49 (93%)

われわれはすでに、低出力レーザー照射したマウス骨芽細胞様細胞から遺伝子バンクを作成し、レーザー非照射細胞から回収した mRNA を結合させて取り除き、レーザー照射によって発現促進した約 50 遺伝子クローンを単離している。DNA ホモロジー検索の結果から、細胞周期のライセンス因子¹⁰⁾や ATP 合成酵素の F0F1-ATPase¹¹⁾などの遺伝子を同定することに成功している。

本研究では、新たにレーザー照射 MC3T3E-1 の差分化 88 遺伝子クローンについて塩基配列を解読した。その結果、特にホモロジーが高かった既知遺伝子として、mitochondria ribosomal protein L11, GDP-dissociation inhibitor, annexin III, protein phosphatase, MSX-interacting-zinc finger protein, Fraconi anemia group G protein などが同定された。また、ホモロジーが極めて高い EST クローンを数個同定された。

ribosomal protein L11 は、EF-G の機能に関与することが報告されており、タンパク質合成過程で重要な働きをされると考えられている¹²⁾。GDP-dissociation inhibitor, protein phosphatase, G protein はいずれも情報伝達系において重要な役割を果たしている。Annxin III は、エナメル芽細胞や象牙芽細胞に見いだされており¹³⁾、細胞カルシウムの調節に関与するといわれている¹⁴⁾。MSX-2 は、顎顔面の発育に関与することが知られているが¹⁵⁾、MSX-

interacting-zinc finger protein は、MSX-2 の応答性エレメント DNA への結合に関与すると示唆されている¹⁶⁾。今後、RT-PCR 法やノーザンブロット法によって mRNA レベルが上昇しているかを確認し、これら遺伝子の転写の促進が、どのように骨芽細胞の増殖、分化に関与するかの研究を進める必要がある。

また、EST クローンのなかには、ホモロジーが極めて高い EST 遺伝子が多く同定されている。マウスのゲノムプロジェクトが進展しており、新規に同定され機能が判明する遺伝子の情報がデータベースに蓄積されていくことから、ホモロジー検索を続けることによって新規遺伝子の発見が期待できる。

結 論

骨芽細胞 MC3T3E-1 に Ga-Al-As 半導体レーザー（モデル Panalas-1000, 波長 830nm）照射し、非照射細胞の mRNA を用いて差分化遺伝子ライブラリーを作成した。新たに 88 遺伝子クローンの塩基配列を解読し、DNA データベースとホモロジー検索を行った。その結果、情報伝達系、タンパク合成系などに関与する遺伝子が同定された。これらの結果から、低出力レーザー照射は、これら遺伝子の転写促進により、骨芽細胞の増殖、分化に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の科学研究費補助金基盤研究(A-1, 13357059)および学術フロンティア研究推進事業の補助を受けた。レーザー装置の使用について松下産業機器社の御協力に感謝致します。

文 献

- 1) Mester, E., Mester, A.F. and Mester, A.: The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg. Med.*, **5**, 31-39, 1985.
- 2) Ohshiro, T. and Calderhead, R.G.: Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **9**: 267-275, 1991.
- 3) Vukmirovic, O.G. and Tilghman, S.M.: Exploring genome space. *Nature*, **405**: 820-822, 2000.
- 4) Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nishina, Y., Nozaki, M., Nojima, H. and Nishimune, Y.: Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett.*, **355**: 4-10, 1994.
- 5) Kodama, H., Amagi, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S.: Establishment of clonal osteogenic osteoblastic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.*, **23**: 899-901, 1981.
- 6) Hosoya, S., Tamura, K., Nomura, K., Abiko, Y.: Construction of subtracted osteoblast cDNA library with laser-irradiation-enhanced transcription. *Laser Therapy*, **9**: 107-114, 1997.
- 7) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467, 1977.
- 8) Ozawa, Y., Shimizu, N., Mishima, H., Kariya, G., Yamaguchi, M., Takiguchi, H., Iwasawa, T. and Abiko, Y.: Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. *Advanced Laser Dentistry, International Conference*, p 281-288, 1995.
- 9) Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G. and Abiko, Y.: Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, **22**: 347-354, 1998.
- 10) Yamamoto, M., Tamura, K., Hiratsuka, K. and Abiko, Y.: Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med. Sci.*, **16**: 213-217, 2001.
- 11) Tamura, K., Hosoya, S., Takema, T., Sakurai, Y., Fujii, T. and Abiko, Y.: Low level laser irradiation enhances expression of F0F1-ATPase subunit-b gene in osteoblastic cells. *Laser Therapy*, **10**: 107-116, 1998.
- 12) Agrawal, R.K., Linde, J., Sengupta, J., Nierhaus, K.H. and Frank, J.: Localization of L11 protein on the ribosome and elucidation of its involvement in EF-G-dependent translocation. *J. Mol. Biol.*, **311**: 777-787, 2001.
- 13) Le Cabec, V. and Maridonneau-Parini, I.: Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem. J.*, **15**: 481-487, 1994.
- 14) Goldberg, M., Feinberg, J., Rainteau, D., Lecolle, S., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. and Weinman, S.: Annexins I - VI in secretory ameloblasts and odontoblasts of rat incisor. *J. Biol. Buccale.*, **18**: 289-298, 1990.
- 15) Foerster-Potts, L. and Sadler, T.W.: Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev. Dyn.*, **209**: 70-84, 1997.
- 16) Wu, L., Wu, H., Ma, L., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J.R., Lyons, G.E. and Maxson, R.: Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech. Dev.*, **65**: 3-17, 1997.