ウシエナメリンの分離精製とモノクローナル 抗体および2次元電気泳動による同定

小 方 頼 昌

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (主任: 佐々木哲教授)

〔受付: 昭和62年7月22日〕

Isolation, purification of bovine enamelines and their identification by monoclonal antibodies and two-dimensional gel electrophoresis

Yorimasa Ogata

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Tokyo

Medical and Dental University

(Director: Prof. Satoshi Sasaki)

1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo; 113

〔Accepted for publication: July 22, 1987〕

Key words: Enamel protein / enamelines / amelogenins / two-dimensional gel electrophoresis / monoclonal antibody

Abstract: Enamelins were extracted with 4M guanidine HCl, 0.5 M EDTA from immature enamel at the secretory stage of developing bovine permanent incisors according to the method of Termine et al. Four fractions of enamelins having different molecular weights (70K, 45K, 30K and 28K daltons) were purified by a chromatography series; DEAE-Sephacel, Sephacryl S-200 and gel filtration HPLC. Their amino acid compositions were found to be rich in Pro, Glu, Gly and Asp. Low molecular weight enamelins (45K, 30K and 28K daltons) were more abundant in Pro, Gly and Phe. Monoclonal antibodies against bovine enamelins were successfully raised in mice. Two-dimensional electrophoresis pattern of enamelins revealed many spots which immunoreacted with the monoclonal anti-enamelin antibody. This result indicated that enamelins were comprised of heterogenous proteins as well as amelogenins. While enamelins and amelogenins had different isoelectric points, two-dimensional gel electrophoresis was found to be a useful method in order to distinguish or to separate the two protein classes, in addition to immunological methods.

緒 言

歯の発生において、口腔上皮由来のエナメル質と間葉系由来の象牙質は隣接し、互いに作用し合いながら発育し、歯を形成するが、両者の石灰化の様式はまったく異なっている¹⁻³⁾。完成された象牙質には約15-26%の有機質が存在し、その内

の少なくとも90%はコラーゲンである⁴⁾。一方、成熟したエナメル質には有機質はほとんど存在しないが、形成初期のエナメル質中には約30%のタンパク質が存在する⁴⁻⁷⁾。このエナメルタンパク質は、近年2つのクラスに分類されるようになった。1つはアメロジェニン (Amelogenins)、他はエナメルリン (Enamelins) である⁸⁻¹⁵⁾。アメロジェニンは、幼若エナメル質中の有機質の90-95%

を占める一群のタンパク質で、エナメル質を脱灰することなく塩酸グアニジンで容易に抽出される。分子量は5,000-27,000、そのアミノ酸組成はプロリン、グルタミン酸、ロイシン、ヒスチジンに富み、エナメル質の成熟とともに分解され、消失する^{4,16-24)}。ウシのアメロジェニンに関しては、全アミノ酸配列²⁵⁾および cDNA の塩基配列が²⁶⁾、マウスでは cDNA の塩基配列が²⁷⁾、ブタではアミノ酸配列の大部分が、すでに報告されている^{28,29)}。

エナメルリンは、残りの5-10%を占める酸性の糖タンパク質で、エナメル質の結晶に強く結合し、脱灰することにより初めて抽出される。現在報告されている分子量は50,000-70,000で、そのアミノ酸組成はプロリン、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸に富み、成熟後期までエナメル質中に残存する^{9,10,30-34)}。またアパタイトに吸着能を有し、*in vitro* で結晶成長を強く抑制することから、石灰化における役割が注目されている^{35,36)}。しかしながらアメロジェニンと比べると、エナメルリンに関する報告は少なく、その性状については不明なところが多い。

本研究では、エナメルリンの性質を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。まずウシ歯胚よりエナメルリンを抽出し、これに対するマウスのモノクローナル抗体を作製した。この抗体の特異性を確認したのち、エナメルリンと他のタンパク質との識別に用いた。各種クロマトグラフィーを組合わせて、エナメルリンを精製し、分子量の異なる4つの画分(70K, 45K, 30K および28K daltons)を単離することができた。さらにこれらの画分の2次元電気泳動における挙動、抗体反応性についても調べた。

実験材料及び方法

(1) エナメルリンの抽出

生後約1年のウシ下顎前歯永久歯胚を採取し、歯髄、歯小囊、その他軟組織および血液成分などを注意深く除去し、基質形成期に相当するチーズ様のエナメル質をスパーテルを用いてかき集めた。

Termine らの方法¹⁰⁾に従い、5gのエナメル質に対し、1Lの4M guanidine HCl を含む0.05M

Tris buffer pH 7.4 により、4°C にて攪拌しながら1週間抽出し(“G” extract)、遠心後その沈澱を、同量の0.5M EDTA および4M guanidine HCl を含む0.05M Tris buffer pH 7.4 により、4°C にてさらに1週間抽出した(“E” extract)。抽出用緩衝液には、プロテアーゼインヒビターとして0.1M 6-amino-n-caproic acid, 0.005M benzamidine/HCl および0.001M Phenylmethylsulfonyl fluoride を加えた。以上の操作により“G”extract では主としてアメロジェニンが、“E”extract では主としてエナメルリンが抽出されてくることを、電気泳動その他で確かめた。抽出物は Amicon YM-10 filter (Mr.=10,000 cut off) にて濃縮後、蒸留水に対して透析、脱塩し、凍結乾燥して以後の実験に使用した。

(2) エナメルリンの精製

“E” extract は DEAE-Sephacel (Pharmacia) イオン交換クロマトグラフィー(7M 尿素を含む0.05M Tris buffer pH 7.4, 2.5×10cm カラム)にて素通り画分(DEAE unbound fr.)と吸着画分(DEAE bound fr.)に分画した。流速は30 ml/h とし、10 ml ずつのフラクションを集めた。0-1M NaCl 濃度勾配(全量60ml)により溶出する画分(DEAE bound fr.)は、モノクローナル抗体作成時の抗原として使用した。この画分には血清アルブミンの混在が確認されたので、同じ DEAE カラムで0-0.3M NaCl という緩やかな濃度勾配(全量600ml)にて溶出し、4つに分かれた画分のうち、アルブミンを除いた画分を集めて、さらに Sephacryl S-200 (Pharmacia) ゲル濾過クロマトグラフィー(4M guanidine HCl を含む0.05M Tris buffer pH 7.4, 2.5×100 cm カラム2本接続)により分画した。流速は16ml/h とし、5.3ml ずつのフラクションを集めたところ、4つの画分に分かれたので、さらに各画分を、同カラムにて再クロマトグラフィーを行った。次に HPLC ゲル濾過クロマトグラフィー(Waters protein pak 125, 7.8 mm×30 cm カラム2本接続, 4M guanidine HCl を含む0.05M Tris buffer pH 7.4)にて精製を行った。流速は1 ml/1 min とし、230nm の吸光度で測定したピークを分取し、蒸留水に対して透析、脱塩後、凍

結乾燥して、以後の分析に供した。

(3) 化学的分析

アミノ酸分析は、試料を 6 N HCl (0.01 % 2-mercaptoethanol を含む) 中で減圧、封管下 110°C, 24h 加水分解した後、日立アミノ酸分析計 835 型およびベックマン 6300 型アミノ酸分析計に掛けて行った。タンパク質の定量は、Lowry 法³⁷⁾により行った。シアル酸は、過ヨウ素酸—レゾルシノール法³⁸⁾で、ヘキササミンは、試料を 4 N HCl 中で減圧、封管下 100°C, 4 h 加水分解後、Levvy らの方法^{39,40)}にて定量した。

(4) モノクローナル抗体の作製

抗原として“E” extract の DEAE bound fr. (0-1 M NaCl 溶出画分) を用いた。凍結乾燥重量 50 μ g の抗原を、100 μ l の Phosphate-buffered saline (PBS) と 100 μ l の Freund 完全アジュバントと共に懸濁し、BALB/c マウス腹腔内に注射した。2週間後に同量の抗原を、100 μ l の PBS と 100 μ l の Freund 不完全アジュバントと共に懸濁して、同マウスの腹腔内に再注射し、さらに2週間後に、同量の抗原を 200 μ l の PBS と混和して、同マウス腹腔内に注射し、最終免疫とした。最終免疫 4 日後に、マウスより脾臓を採取し、その脾細胞 1 $\times$ 10⁸個と、あらかじめ培養しておいた 1 $\times$ 10⁷個のマウス myeloma cell line NS-1 を混和し、ポリエチレングリコール法により融合した。融合細胞は、HAT 培地 [15% fetal calf serum (FCS) および 2% HAT solution を含む Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM)] に 5 $\times$ 10⁶個/ml になるように浮遊し、96穴マイクロウエルプレートに 50 μ l/well の割合で分注した。3日ごとに 50 μ l の HAT 培地を加え、CO₂ incubator (5% CO₂ in air, 37°C) にて培養した。HAT solution は 5 mM Hypoxanthine, 20 μ M Aminopterin および 800 μ M Thymidine 水溶液を使用した。ハイブリドーマは HAT 培地により選択し、抗体の産生は後述の ELISA 法および Western blot 法により確認した。クローニングは限界希釈法により 2 回行い、クローニングしたハイブリドーマは、HAT 培地から HT 培地 (HAT 培地から Aminopterin を除いたもの) を経て、通常の培地 (15% FCS を含む D-MEM)

で培養した。

得られたクローンは、D-MEM (15% FCS) 培地にて大量培養し、その 1 $\times$ 10⁷個を、4週間前に 0.5ml プリスタン (Sigma) を投与した BALB/c マウス腹腔内に注射し、その腹水を採取した。腹水は 50% 硫酸アンモニウムによる沈澱後、少量の 0.04M NaCl を含む 0.02M Tris buffer pH 7.8 に溶解し、さらに 0.02 M NaCl を含む 0.02 M Tris buffer pH 7.8 に対して透析後、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、その上清を使用直前まで -80°C で凍結保存した。抗体は、溶解後は 4°C にて保存した⁴¹⁻⁴³⁾。

(5) アメロジェニンの精製およびポリクローナル抗体の作製

“G” extract をエナメルイン精製に使用したものと同カラム、同条件の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー (0-1 M NaCl 濃度勾配) にかけ、その素通り画分 (“G” extract DEAE unbound fr.) をエナメルインを含まないアメロジェニンとして使用した。

アメロジェニンポリクローナル抗体は、下川らにより作製されたもので、この抗体がエナメルインと交叉反応を示さないことはすでに報告されている⁴⁴⁾。

(6) ELISA 法

抗原 (モノクローナル抗体の作製に使用したエナメルイン画分) を Voller の緩衝液⁴⁵⁾ (0.02% NaN₃ を含む 0.015M Na₂CO₃, 0.035M NaHCO₃ buffer pH 9.6) に 400ng/200 μ l になる様に溶解し、96穴マイクロタイタープレート (Polyvinyl chloride, Dynatech Lab.) のウエルに 200 μ l ずつ加え、4°C, 12h 以上放置して、ウエルに吸着させた。0.05% Tween 20 を含む PBS (Tween/PBS) にて 3 回洗浄後、融合細胞の培養上清を 100 μ l ずつ加え、室温で 1h 反応させ、再び Tween/PBS で 3 回洗った。次に 2 次抗体として、ペルオキシダーゼを結合させた抗マウス Ig (G+A+M) ヤギ血清 (Cappel) を Tween/PBS にて 1000 倍希釈して 100 μ l ずつ加えた。室温で 1h 反応後、過剰の 2 次抗体を Tween/PBS で洗い流したのち、基質溶液 (10 mg O-phenylenediamine を 1 ml Methanol に溶解し、99ml の H₂O と 10

μl の 30% H_2O_2 を加えた溶液) を $175\mu\text{l}$ ずつ加え、25min 反応させた。 $25\mu\text{l}$ の 8 M 硫酸にて反応を停止後、タイターテックマルチスキャン MC フォトメーター (Flow Lab.) にて 492nm で測定した⁴⁶⁾。

(7) SDS 電気泳動

Laemmli の方法⁴⁷⁾ に従い、1 mm 厚 ($14 \times 14\text{cm}$) スラブ 15-30% 濃度勾配 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。0.8% の N, N'-メチレンビスアクリルアミド (Bio Rad Lab.) を含む 45% アクリルアミド (第一化学薬品) 水溶液を作製し、分離ゲルには 0.375 M Tris HCl buffer pH 8.8 を、濃縮ゲルには 0.25 M リン酸を含む 0.125 M Tris buffer pH 6.8 を使用した。0.1% になるようにラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を加え、30% および 15% 濃度の 2 種類のアクリルアミド溶液を作り、重合促進剤として、0.33% 量の 10% 過硫酸アンモニウム水溶液と、0.028% 量の N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えた後、濃度勾配調製装置にてゲルを作製した。試料 ($20\text{--}50\mu\text{g}$ 凍結乾燥重量) は試料用緩衝液 (2.3% SDS, 10% glycerol, 0.1% 2-mercaptoethanol および 0.1% bromphenol blue を含む 0.06 M Tris buffer pH 6.8) に溶解し、 100°C 、5 min 処理後、泳動を行った。泳動緩衝液は 0.1% SDS, 0.38 M glycine を含む 0.05 M Tris buffer pH 8.3 を使用し、ゲル 1 枚につき、5 mA で約 20h 泳動後、クマシーブリリアントブルー R250 による染色⁴⁸⁾ または 銀染色⁴⁹⁾ を行った。

(8) 2 次元電気泳動

1 次元目に等電点電気泳動、2 次元目に 15-30% 濃度勾配 SDS-PAGE を行った⁵⁰⁾。

等電点電気泳動用ゲルは、8.5 M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミド中に、両性担体として Pharmalyte (Pharmacia) を加え、 $2.5\text{mm} \times 110\text{mm}$ のガラスカラム中に作成した。Pharmalyte は、全量に対し 1% 量の pH 3-10 および pH 6-8, 3% 量の pH 4-6 を使用し、陰極には 20 mM NaOH を、陽極には 10 mM リン酸を用いた。試料 ($200\text{--}300\mu\text{g}$ 凍結乾燥重量) は試料用緩衝液 [8.5 M 尿素を含む 2% Pharmalyte (pH 3-10) 水溶液]

に溶解し、ゲルの上にのせて泳動を行った。通電開始後 1 h は 150V で、さらに 300V にて 10h、終了前 1 h は 600V で泳動し、通電中は常に水道水にて冷却を行った。等電点ゲルは、試料用緩衝液 (2% SDS, 0.1% bromphenol blue および 5% 2-mercaptoethanol を含む 0.0625 M Tris buffer pH 6.8) にて 40°C 、10min、2 回処理後、0.1% アガロース (同試料用緩衝液中) にて 15-30% 濃度勾配 SDS ポリアクリルアミドゲル上に固定し、その後は通常の電気泳動と同じ方法にて 2 次元目の泳動を行った。等電点泳動後のゲル中の pH の分布を測定するために、 $5\text{mm} \times 110\text{mm}$ のゲルを作製し、サンプルを加えずに泳動後、端から 5 mm ずつの長さに 22 等分した。切り出したゲルはそれぞれ 1 ml 蒸留水中に 4°C 、12h 以上放置し、微小電極を用いて pH を測定した。

(9) Western blot 法

SDS-PAGE 終了後、Towbin らの方法⁵¹⁾ により Western blot を行った。Blotting buffer として 20% Methanol および 0.192 M Glycine を含む 0.025 M Tris buffer を使用し、トランスブロット装置 (Bio Rad Lab.) にて、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (Pore size $0.45\mu\text{m}$, Bio Rad Lab.) に転写した (30V 40min)。ニトロセルロース膜は、3% ウシ血清アルブミンを含む 0.9% NaCl, 10 mM Tris buffer pH 7.4 (TBS) 中に 1 h 浸し、培養上清または TBS にて 1000 倍希釈したモノクローナル抗体を加え、室温で 1 h 以上反応させた。TBS で 3 回洗ったのち、2 次抗体として ペルオキシダーゼを結合させた抗マウス Ig (G+A+M) ヤギ血清 (Cappel) を、TBS にて 1000 倍希釈して 1 h 反応させた。再び TBS で 3 回洗った後、基質溶液 (30mg 4-Chloro-1-naphthol を 10ml Methanol に溶解し、50ml の TBS と $100\mu\text{l}$ の 30% H_2O_2 を加えた溶液) を加えて発色させた。

(10) Dot blot 法

試料 ($1\mu\text{g}$ 凍結乾燥重量) を $50\mu\text{l}$ の PBS に溶解し、Minifold (Schleicher & Schuell) を使用して、ニトロセルロース膜上にスポットした。その後の操作は Western blot 法に準じて行った。

結 果

1) 抗エナメルリンモノクローナル抗体の性質

“E” extract DEAE bound fr. (0-1M NaCl 濃度勾配溶出, Fig. 5-A) を抗原として, モノクローナル抗体を作製し, クローニングを2回行った結果, 3つのクローンが得られた。それぞれを3A3, 6C8, 6G10と名付け, サブクラスを調べたところ, 2つ(3A3, 6C8)がIgG₁, 1つ(6G10)がIgMで, エナメルリンに対する反応性は, 3つの抗体とも同じであった。そのため, 抗エナメルリンモノクローナル抗体として, 腹水より調製した3A3を1000倍希釈にて使用した。抗エナメルリンモノクローナル抗体が, 他の組織のタンパク質やアメロジェニンと反応しないことを確かめるために以下の実験を行った。Fig. 1は象牙質中のタンパク質と抗エナメルリンモノクローナル抗体との反応性を調べたものである。エナメル質と同じ方法で抽出した象牙質の“G” extract, “E” extract とエナメル質の“E” extract を同時に電気泳動し (Fig. 1-A), Western blot 後, 抗エナメルリンモノクローナル抗体を用い発色させたところ (Fig. 1-B), 象牙質中のタンパク質とはまったく反応を示さなかった。Fig. 2はさらに Dot blot により検索したもので, 抗エナメルリンモノクローナル抗体は, アメロジェニン, 血清タンパク質, 象牙質中のタンパク質とは反応せず, 後述するような方法で分離精製した, エナメルリンの4つの成分とのみ反応した (Fig. 2-A)。一方, 抗アメ

Fig. 1 Immunoelectrophoretic detection of enamelin by the Western blot technique. (A) SDS-PAGE separated proteins stained with Coomassie brilliant blue R-250; lane (1) dentin "G" extract; lane (2) dentin "E" extract; lane (3) enamel "E" extract. (B) Nitrocellulose filter transblotted from gel (A) and stained with anti-enamelin monoclonal antibody. The molecular weight markers used were phosphorylase b (94,000 daltons), bovine serum albumin (67,000 daltons), ovalbumin (43,000 daltons), carbonic anhydrase (30,000 daltons), soybean trypsin inhibitor (20,000 daltons) and α -lactalbumin (14,000 daltons).

Fig. 2 Immunodot detection of enamelin and amelogenins by the dot blot technique. (1) 70K enamelin; (2) 45K enamelin; (3) 30K enamelin; (4) 28K enamelin; (5) amelogenins ("G" extract DEAE unbound fr.); (6) fetal calf serum; (7) dentin "G" extract; (8) dentin "E" extract. (A) Nitrocellulose filter stained with anti-enamelin monoclonal antibody. (B) Nitrocellulose filter stained with anti-amelogenin polyclonal antibody.

Fig. 3 Outline of purification procedures of amelogenins and enamelins from bovine immature enamel.

ロジェニンポリクローナル抗体は（400倍希釈にて使用），アメロジェニン（“G” extract DEAE unbound fr.）とのみ反応した（Fig. 2-B）。

2) エナメルリンの抽出及び精製

エナメルリンの抽出および精製過程は Fig. 3 の通りである。“G” extract は全抽出物の 94.4%，“E” extract は 5.6% であった。まず “G” extract および “E” extract について，15-30% 濃度勾配 SDS-PAGE による泳動パターンを Fig. 4 に示す。この結果から “G” extract は，主として分子量 27K 以下のアメロジェニンに富む画分，“E” extract は分子量 28K-70K の範囲のエナメルリンに富む画分であることが示された。

“E” extract を DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーにかけ，0-1 M NaCl 濃度勾配により溶出すると，吸着画分は分離せずに 1 つのピークとして溶出した（Fig. 5-A）。溶出を 0-

0.3M NaCl 濃度勾配にて行くと（Fig. 5-B），4 つのフラクションに分かれて溶出したため，それぞれのピークを DEAE bound fr. 1-4 と名付けた。分離した 4 つのピークを，透析，凍結乾燥したのち，比較のために，アメロジェニン（“G” extract DEAE unbound fr.）と同時に電気泳動し（Fig. 6-A），Western blot 後，抗エナメルリンモノクローナル抗体にて発色させたところ（Fig. 6-B），DEAE bound fr. 2, 3, 4 に反応性のバンドが数個ずつ認められた。Fr. 1 では，ほぼ 67K 付近にバンドが認められるが，このバンドは抗エナメルリンモノクローナル抗体とは反応せず，アルブミン抗体と反応することから，アルブミンであることが明らかになった。また，アメロジェニンはどの画分も，抗エナメルリンモノクローナル抗体とは交叉反応を示さなかった（Fig. 6-B の lane Am）。次に，エナメルリン画分が含まれることが示

Fig. 4 Gradient SDS-PAGE of "G" extract (left) and "E" extract (right) stained with Coomassie brilliant blue R-250. The molecular weight markers are the same as in Fig. 1.

された DEAE bound fr. 2-4 を、まとめて Sephacryl S-200 ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画した (Fig. 7)。そのクロマトパターンから、I-IV の4つのフラクションに分けることができたが、ピークIVの後ろにある小さな肩は、電気泳動ではバンドを認めることが出来なかったので、以後精製には供しなかった。I-IVの各フラクションの精製を進めるため、同じカラム (Sephacryl S-200) により再クロマトグラフィーを行った (Fig. 8)。再クロマトグラフィーにより分取した各フラクションは、更に HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った (Fig. 9)。そのクロマトパターンは、ほぼシングルピークであったため、ピークの部分のみを分取した。HPLC により精製したエナメルリンを SDS-PAGE にて調べたところ (Fig. 10)、I は分子量70K、II は45K、III は30K、IV は28K のタンパク質のバンドを有していた。分子量70K、30K のエナメルリンは、単一のバンドにまで精製されたが、45K、28K のエナメルリンは、近接して2つのバンドを認めた (Fig. 10 の矢印)。この4つの分子量の異なるエナメルリン

Fig. 5 DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography of enamel "E" extract. The salt gradient is indicated by the dashed line at concentrations shown at the right hand margin. (A) 0-1M NaCl gradient. (B) 0-0.3M NaCl gradient.

を Western blot 後、抗エナメルリンモノクローナル抗体にて発色させると、70K、45K エナメルリンは強い発色を示すが、30K、28K エナメルリンの発色は非常に弱く、時にはまったく反応を示さない場合も見られた。精製したエナメルリンのアミノ酸組成を見ると (Table 1)、4つのフラクションとも類似のパターンを示し、プロリン、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸の含有量が多かった。45K、30K、28K の組成は、70K エナメルリンと比べて、さらにプロリン、グリシンが多く、30K、28K の組成はフェニルアラニンが多かった。エナメルリン中のタンパク質、シアル酸、ヘキシサミンの含有率 (Table 2) を調べると、エナメルリンは糖鎖 (シアル酸とヘキシサミンを合計したもの) をその重量の約 6.7-21.3% の高率で含有することが分かった。

3) 二次元電気泳動

等電点ゲル中の pH の分布は、測定の結果 pH

Fig. 6 Immunoelectrophoretic detection of enamelines by the Western blot technique. (A) SDS-PAGE separated proteins stained by silver staining; lane (Am) amelogenins ("G" extract DEAE unbound fr.); lane (1) DEAE bound fr. 1; lane (2) DEAE bound fr. 2; lane (3) DEAE bound fr. 3; lane (4) DEAE bound fr. 4. (B) Nitrocellulose filter transblotted from gel (A) stained with anti-enamelin monoclonal antibody.

Fig. 7 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography in 4M guanidine HCl of "E" extract DEAE bound fr. 2-4.

4-8 の範囲で直線の pH 勾配を示すことが分かった。

"G" extract (アメロジェニンに富む画分) と "E" extract (エナメルインに富む画分) を同量混合し、2次元電気泳動を行なった (Fig. 11-A)。その模式図が Fig. 11-B である。それぞれ単独に行なった2次元電気泳動の結果から判定して、白い

スポットはエナメルイン、黒はアメロジェニンである。また抗体との反応性から、アルブミンと思われるスポットは斜線の部分であった。これを見ると、等電点6.5よりも酸性側にエナメルイン、等電点7よりも塩基性側にアメロジェニンが位置し、2次元電気泳動を用いれば、両者を容易に区別できることがわかった。アルブミンはエナメルインとアメロジェニンの中間に位置していた。

次にエナメルイン ("E" extract DEAE bound fr. 0-1 M NaCl 溶出画分) の2次元電気泳動を行った (Fig. 12-A)。その泳動パターンを見ると、70K、45K、30K、28K のエナメルインは低分子になるほど等電点が酸性になり、それぞれのスポットは横に数珠状に連なっていた。同じゲルを Western blot し、抗エナメルインモノクローナル抗体にて発色させると (Fig. 12-B)、血清由来のアルブミンを除く、殆ど全てのスポットが発色を示した。70K、45K エナメルインは強い発色を示すが、それに比べ30K、28K エナメルインの発色は非

Fig. 8 Sephacryl S-200 rechromatography of S-200 fr. I-IV. ; A, fr. I ; B, fr. II ; C, fr. III ; D, fr. IV.

常に弱かった。

4) 分子量の異なるエナメルリンと抗エナメルリンモノクローナル抗体との反応性の比較

精製された4つのエナメルリン分子と、抗エナメルリンモノクローナル抗体との反応性を見る目的で Dot blot を行った (Fig. 2-A)。

70K, 45K, 30K, 28K のエナメルリンは等量ずつ (1 μ g) スポットしたが、発色に違いが見られ、45K>70K>30K>28K の順に強い発色を示した。このことから抗体に対する反応性に差があることが判明した。

考 察

脱灰後に抽出される“E” extract は、エナメルリンを多量に含むがアメロジェニンおよび血清由来のタンパク質の混入がある。そのため精製の第1ステップとして DEAE イオン交換クロマトグラフィーにより分画することは有効な手段と思われる。

Fig. 9 Elution profiles of rechromatographed S-200 fr. I-IV on HPLC gel filtration column in 4M guanidine HCl. Elution time is shown beside the peak.

Fig. 10 SDS-PAGE of enamelins after purification with HPLC gel filtration stained with Coomassie brilliant blue R-250. lane (1) 70K ; lane (2) 45K ; lane (3) 30K ; lane (4) 28K.

る。この方法を使うと、混入したアメロジェニンは DEAE unbound fr. に分離される。DEAE bound fr. を 0-1 M NaCl 濃度勾配で急速に溶出すると、血清由来のアルブミンもエナメルリンと一緒に溶出される。両者は分子量が近似するため、1次元電気泳動で区別することは困難である。0-

Table 1 Amino acid composition of 4 fractions of bovine enamelines; tr=trace.

<AMINO ACID ANALYSIS>				
	70K	45K	30K	28K
ASP	94	96	77	84
THR	54	67	77	74
SER	67	72	58	73
GLU	136	146	165	138
PRO	168	211	223	206
GLY	92	116	122	122
ALA	58	40	36	39
VAL	43	17	16	32
MET	19	12	7	19
ILE	23	19	14	14
LEU	50	28	17	16
TYR	tr	tr	tr	tr
PHE	57	61	81	78
HIS	37	32	24	20
LYS	50	41	41	45
ARG	52	42	42	40

(residues/total 1000 residues)

Table 2 Concentrations of protein, sialic acid and hexosamine in purified enamelin fractions.

	70K	45K	30K	28K
Protein	93.3	85.4	78.4	81.7
Sialic acid	1.7	2.8	4.0	4.3
Hexosamine	5.0	11.8	17.3	14.0

(%) by weight

0.3M NaCl 濃度勾配にて緩やかに溶出させると、アルブミンとエナメルリンは分離して溶出するので (Fig. 5 の fr. 2, 3, 4), 以後の精製はアルブミン混入の心配のない状態で行うことができる。

今回の実験では、その後、ゲル濾過と HPLC を組み合わせた結果、エナメルリンの 4 画分 (70K, 45K, 30K, 28K) を、それぞれ殆ど単一のバンドとして分離精製することができた。これまでの報告では、エナメルリンはアメロジェニンに比べ分子量の大きいタンパク質で、その分子量は 50-70K と言われてきた¹⁰⁻¹⁵⁾。しかし、エナメルリンの同定はまだ完全にされておらず、電気泳動的にも、エナメルリンのバンドをアメロジェニンとはっきり区別して示してあるものは僅かしかない⁴⁴⁾。また低

Fig. 11 (A) Two-dimensional electrophoresis of bovine enamelines ("E" extract) and amelogenins ("G" extract). Equal amounts of "E" extract and "G" extract were applied to the gel and stained with Coomassie brilliant blue R-250. (B) Schematic map for proteins stained in (A). Horizontal scale: pH gradient; Vertical scale: molecular weight markers. White to spots represent enamelines. Black spots represent amelogenins. Hatched spot represents serum albumin.

分子のエナメルリンはアメロジェニンと分子量が近接するために、両者の区別は非常に困難であった。エナメルリンを精製し、その性質について調べた報告はなく、今回の報告が初めてのものである。

過去のエナメルタンパク質の研究において、アメロジェニンおよびエナメルリン、あるいはそれらの高分子の前駆体を探す指標として、ポリクローナル抗体が多く使用され、その抗原として、精製が不完全なアメロジェニンやエナメルリンが使われることが多かった。その結果、アメロジェニンと

Fig. 12 Immunoelectrophoretic detection of enamelines by the Western blot technique. (A) Two-dimensional electrophoresis of bovine enamelines ("E" extract DEAE bound fr.) stained with Coomassie brilliant blue R-250. (B) Nitrocellulose filter transblotted from gel (A) stained with anti-enamelin monoclonal antibody.

エナメルリンの間に交叉反応が生じ、エナメルリンはアメロジェニンの前駆体または会合体であろうと思われていた⁵²⁻⁶¹⁾。ところが近年、下川⁴⁴⁾、Christner^{62,63)}らによりアメロジェニンのモノクローナル抗体が、Rosenbloom⁶⁴⁾らによりエナメルリンのモノクローナル抗体が作製され、アメロジェニンとエナメルリンの間には交叉反応が認められないことが報告されている。今回のエナメルリンのモノクローナル抗体を使った実験からも、同様の結果が得られたことから、アメロジェニンとエナメルリンは全く異なるタンパク質であると思われる。

精製の結果、70K, 30K エナメルリンは、単一バ

ンドにまで精製されたが、45K, 28K エナメルリンは近接して2つのバンドを認めた。バンドが近接して存在する理由は明かではないが、糖鎖の結合度の違いや、加水分解によるわずかな分子量の違いも考えられる。4つのエナメルリン画分のアミノ酸組成 (Table 1) を見ると、70K エナメルリンは、チロシンが殆ど認められない以外は、Termine ら¹⁰⁾ が報告したエナメルリンのアミノ酸組成に近似していた。45K, 30K, 28K エナメルリンは70K に比べ、プロリン、グリシンが多く、また30K, 28K エナメルリンはフェニルアラニンが多いが、全体的に見ると4つのエナメルリンとも類似の組成を示していた。エナメルリンは糖タンパク質であることが知られているが¹⁰⁾、精製されたエナメルリンの糖鎖に関する報告はない。4つのエナメルリン画分のシアル酸およびヘキソサミンの含有量 (Table 2) から、低分子のエナメルリンの方が、糖鎖含量が多いことが分かった。糖鎖が結合している部分は、タンパク質分解酵素による分解を受けにくく、糖の結合の少ない部分が先に分解されると考えると、分解を受けた後に残る部分 (低分子のエナメルリンと予想される) は、糖鎖を多く有すると思われる。エナメルリンの2次元電気泳動のパターンは、低分子のものほど酸性で、それぞれのスポットが横に数珠状に連なり、等電点に広がりを持っていた。分子量が同じエナメルリンが、横に数珠状に連なるのは、糖鎖の末端にシアル酸を有して、その結合数の変化が等電点に変化を与えるためと考えられる。また、結果は示していないが、ノイラミニダーゼにて処理したエナメルリンを、2次元電気泳動すると、等電点が全体的に塩基性側に寄り、スポットの数が減少する結果を得ている。

今回精製できた4つのエナメルリン画分以外に、抗エナメルリンモノクローナル抗体と反応する画分がいくつかあり、とくに DEAE bound fr. 4 (Fig. 6-B の lane 4) で 15-20K の辺りに、濃く染まるバンドが見られた。これらのバンドは、電気泳動したゲルの染色では、ほとんど認められないため、タンパク質量が少ないと思われ、精製することは出来なかったが、抗体に対する抗原決定基を持つものと考えられる。また分子量が小さい

ことから、上記のいずれかの画分の、分解産物である可能性も考えられる。

下川らは、アメロジェニン^{26,44)}は2次元電気泳動で多数のスポットを認める多成分系のタンパク質で、そのスポットの殆ど全てが、抗アメロジェニンポリクローナル抗体と反応すると報告している^{26,44)}。今回の2次元電気泳動の結果、エナメルリンも多数のスポットを認め、それらの殆ど全てが、抗エナメルリンモノクローナル抗体と反応を示すことから、エナメルリンもアメロジェニンと同じ様に、多成分系のタンパク質であると思われる。精製できた4つの画分および、その他電気泳動的に多数認められるエナメルリンは、1つのエナメルリンが分解した結果生じたのか、それとも、最初から同時に、多数のエナメルリン分子が合成されて生じたのか、分かっていない。しかし、抗エナメルリン抗体と反応するエナメルリン成分の中で、70Kのものが最も分子量が大きいことから、70K エナメルリンは分解をうけていない元の分子である可能性が高い。Dot blotの結果から、45K エナメルリンは抗エナメルリンモノクローナル抗体に対する反応性が最も強いことが分かったが、その本態や70K エナメルリンとの関係は不明である。

土井らによると、*in vitro*の実験系で、エナメルリンとアメロジェニンは両方とも、核形成能は持たないが、アパタイト結晶の成長を抑制する効果があり、エナメルリンはアメロジェニンに比べ約3倍強い抑制を示した。そしてその効果は、結晶数を減少させた場合と類似していた^{35,36)}。

柳沢らの報告によると、エナメルリンはアパタイト表面に強く吸着し、結晶表面を覆って存在する^{65,66)}。アメロジェニンはその外周の空間を占め、エナメル質の成熟にともなって、低分子化さ

れながら減少し消失すると考えられている。エナメルリンも分解され減少すると思われるが、成熟後期までエナメル質中に残り、比較的成熟した結晶ではその周りにはエナメルリンのみが存在するらしい。アメロジェニンは疎水性のアミノ酸を多く持ったため、生体内ではゲル状で存在すると思われる。そのゲルの中で、エナメルリンに囲まれたアパタイト結晶は、アメロジェニンが分解され、消失するのと歩調を合わせ、大きくなって行くと思像できる。その際のエナメルリンの分解および低分子化の問題は、今後の研究の課題である。

アパタイト結晶は、basal面にactive siteを持つため、c軸方向に成長しやすい性質を持っている。エナメルタンパク質は、アパタイト結晶のbasal面よりも、プリズム面に吸着しやすいので³⁶⁾、エナメルタンパク質中に存在するアパタイト結晶は、c軸方向に成長しやすく、エナメル質特有の形態を取ると思われる。エナメル質の石灰化の過程を通して、エナメルアパタイト結晶の周囲に、エナメルリンが常に存在することから、エナメルリン自身の性質やアパタイト結晶との相互関係を明らかにすることは、エナメル質の石灰化の機構を知る上での手がかりになると考えられる。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました佐々木哲教授、ならびに本研究の遂行に、終始変わらぬご指導、ご教示を頂いた下川仁弥太助教授に心より感謝いたします。

また、アミノ酸分析を行うにあたり、ご指導を頂きました高木亨講師、ならびにノースキャロライナ大学、津崎まり博士に深く感謝致します。

さらに、数々のご助言、ご協力を頂きました歯学部生化学教室、ならびに歯学部附属病院検査部の皆様に厚くお礼申し上げます。

抄録：ウシ前歯永久歯胚より、基質形成期に相当するエナメル質を採取し、Termineらの方法によりエナメルリンに富む画分を抽出した。DEAE-Sephacel, Sephacry S-200, HPLC ゲル濾過により、70K, 45K, 30K, 28K という分子量の異なる4つのエナメルリン画分を分離精製することができた。そのアミノ酸組成は、プロリン、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸に富んでいた。さらにエナメルリンに対するモノクローナル抗体を作製し、その特異性を確認した。エナメルリンを2次元電気泳動後 Western blot し、モノクローナル抗体と反応させると、殆ど全ての成分が反応した。また、エナメルリンとアメロジェニンを2次元電気泳動すると、等電点が異なるために、両者を完全に区別することができた。以上の結果から、エナメルリンとアメロジェニンは、免疫化学的にもまったく異なるタンパク質であり、多成分系より成ることが確かめられた。

文 献

- 1) 小澤英浩 : 歯の硬組織の発生. 歯の発生学 (大江規玄編, 改訂新版) pp. 61-113, 医歯薬出版, 東京, 1984.
- 2) Slavkin, H. C., Zeichner-David, M. and Siddiqui, M. A. Q. : Molecular aspects of tooth morphogenesis and differentiation. *Mol. Aspects Med.* 4 : 125-188, 1981.
- 3) Greenberg, G., Bringas, P. Jr. and Slavkin, H. C. : The epithelial genotype controls the pattern of extracellular enamel prism formation. *Differentiation* 25 : 32-43, 1983.
- 4) Eastoe, J. E. : Organic matrix of tooth enamel. *Nature* 187 : 411-412, 1960.
- 5) Eastoe, J. E. : The amino acid composition of proteins from the oral tissues-II. *Arch. Oral Biol.* 8 : 633-652, 1963.
- 6) Deakins, M. : Changes in the ash, water, and organic content of pig enamel during calcification. *J. Dent. Res.* 21 : 429-435, 1942.
- 7) Glimcher, M. J., Mechanic, G. L. and Friberg, U. A. : The amino acid composition of the organic matrix and the neutral-soluble and acid-soluble components of embryonic bovine enamel. *Biochem. J.* 93 : 198-202, 1964.
- 8) Eastoe, J. E. : Enamel protein chemistry-past, present and future. *J. Dent. Res.* 58(B) : 753-763, 1979.
- 9) Termine, J. D., Torchia, D. A. and Conn, K. M. : Enamel matrix : Structural proteins. *J. Dent. Res.* 58 (B) : 773-778, 1979.
- 10) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M. and Nylen, M. U. : Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 255 : 9760-9768, 1980.
- 11) Fincham, A. G., Belcourt, A. B., Lyaruu, D. M. and Termine, J. D. : Comparative protein biochemistry of developing dental enamel matrix from five mammalian species. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 182-189, 1982.
- 12) Belcourt, A. B., Fincham, A. G. and Termine, J. D. : Acid-soluble bovine fetal enamelines. *J. Dent. Res.* 61 : 1031-1032, 1982.
- 13) Zeichner-David, M., Slavkin, H. C., Lyaruu, D. M. and Termine, J. D. : Biosynthesis and secretion of enamel proteins during hamster tooth development. *Calcif. Tissue Int.* 35 : 366-371, 1983.
- 14) Zeichner-David, M., MacDougall, M. and Slavkin, H. C. : Enamelin gene expression during fetal and neonatal rabbit tooth organogenesis. *Differentiation* 25 : 148-155, 1983.
- 15) Fincham, A. G., Belcourt, A. B. and Termine, J. D. : Molecular composition of the protein matrix of developing human dental enamel. *J. Dent. Res.* 62 : 11-15, 1983.
- 16) Fincham, A. G., Belcourt, A. B., Termine, J. D., Butler, W. T. and Cothran, W. C. : Amelogenins/Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem. J.* 211 : 149-154, 1983.
- 17) Glimcher, M. J., Mechanic, G. L., Bonar, L. C. and Daniel, E. J. : The amino acid composition of the organic matrix of decalcified fetal bovine dental enamel. *J. Biol. Chem.* 236 : 3210-3213, 1961.
- 18) Eggert, F. M., Allen, G. A., and Burgess, R. C. : Amelogenins/Purification and partial characterization of proteins from developing bovine dental enamel. *Biochem. J.* 131 : 471-484, 1973.
- 19) Fincham, A. G. : Experiments on the DEAE-cellulose chromatography of bovine foetal enamel matrix and the isolation of a low molecular weight fraction. *Tooth Enamel II* (Fearnhead, R. W., and Stack, M. V., eds) pp. 79-87, John Wright, Bristol, 1971.
- 20) Fincham, A. G., Belcourt, A. B. and Termine, J. D. : The molecular composition of bovine fetal enamel matrix. *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues.* (Veis, A., ed) pp. 523-529, Elsevier, North Holland, 1981.
- 21) Fincham, A. G. : Changing amino acid profiles of developing dental enamel in individual human teeth and the comparison of the protein matrix of developing human and bovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 25 : 669-674, 1980.
- 22) Shimokawa, H. and Sasaki, S. : Study on the biosynthesis of bovine enamel protein in vitro. *J. Dent. Res.* 57 : 133-138, 1978.
- 23) Fukae, M. and Shimizu, M. : Studies on the proteins of developing bovine enamel. *Arch. Oral Biol.* 19 : 381-386, 1974.
- 24) Robinson, C., Kirkham, J., Briggs, H. D. and Atkinson, P. J. : Enamel proteins: From secretion to maturation. *J. Dent. Res.* 61(Sp Iss) : 1490-1495, 1982.
- 25) Takagi, T., Suzuki, M., Baba, T., Minegishi, K., and Sasaki, S. : Complete

- amino acid sequence of amelogenin in developing bovine enamel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121** : 592-597, 1984.
- 26) Shimokawa, H., Sobel, M. E., Sasaki, M., Termine, J. D. and Young, M. F.: Heterogeneity of amelogenin mRNA in the bovine tooth germ. *J. Biol. Chem.* **262** : 4042-4047, 1987.
 - 27) Snead, M. L., Lau, E. C., Zeichner-David, M., Fincham, A. G., Woo, S. L. C. and Slavkin, H. C.: DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveal the amino acid sequence for enamel-specific protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129** : 812-818, 1985.
 - 28) 深江 允, 田辺孝子, 清水正春: ブタ幼若エナメル質中の主エナメルタンパクの一次構造. *Jpn. J. Oral Biol.* (抄録) **25** : 29, 1983.
 - 29) Fukae, M., Tanabe, T., Ijiri, H. and Shimizu, M.: Studies on porcine enamel proteins: A possible original enamel protein. *Tsurumi U. Dent. J.* **6** : 87-94, 1980.
 - 30) Robinson, C., Lowe, N.R. and Weatherell, J. A.: Amino acid composition, distribution and origin of "tuft" protein in human and bovine dental enamel. *Arch. Oral Biol.* **20** : 29-42, 1975.
 - 31) Glimcher, M. J., Brickley-Parsons, D. and Levine, P. T.: Studies of enamel proteins during maturation. *Calcif. Tissue Res.* **24** : 259-270, 1977.
 - 32) Belcourt, A. B.: Normal mature human enamel protein. *J. Dent. Res.* **58**(B) : 986-987, 1979.
 - 33) Belcourt, A. B. and Gillmeth, S.: EDTA soluble protein of human mature normal enamel. *Calcif. Tissue Int.* **28** : 227-231, 1979.
 - 34) Belcourt, A. B., Fincham, A. G. and Termine, J. D.: Ethylenediaminetetraacetic acid insoluble protein of adult human enamel. *Caries Res.* **16** : 72-76, 1982.
 - 35) Doi, Y., Eanes, E. D., Shimokawa, H. and Termine, J. D.: Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and amelotin proteins in vitro. *J. Dent. Res.* **63** : 98-105, 1984.
 - 36) 土井 豊, Eanes, E. D., 下川仁弥太, 奥田令以, 秦まゆみ, 亀水秀男, 若松宣一, 後藤隆泰, 森脇 豊, 清水紀子, 吉田定宏, 西川博之, Termine, J. D.: 歯質アパタイトの結晶成長および非晶質リン酸カルシウムの沈着に及ぼすエナメルタンパク, 象牙質リンタンパク, 骨コラーゲンの効果. *日本結晶成長学会誌* **12** : 82-90, 1985.
 - 37) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
 - 38) Jourdian, G. W., Dean, L. and Roseman, S.: The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.* **246** : 430-435, 1971.
 - 39) Levvy, G. A. and Mcallan A.: The n-acetylation and estimation of hexosamines. *Biochem. J.* **73** : 127-132, 1959.
 - 40) Ohkuma, S., Shinohara, T. and Furuhashi, T.: Determination of hexosamines by modified Morgan-Elson reaction. *Proc. Jap. Acad.* **42** : 970-974, 1966.
 - 41) Köhler, G. and EMBO: Hybridoma techniques. EMBO, SKMB Course. pp. 58-60, Cold Spring Harbor, New York, 1980.
 - 42) Galfre, G. and Milstein, C.: Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods in Enzymology* Vol. 73, Part B (Langone, J. J., and Vunakis, H. V., eds) pp. 3-46, Academic Press, New York, 1981.
 - 43) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** : 495-497, 1975.
 - 44) Shimokawa, H., Wassmer, P., Sobel, M. E. and Termine, J. D.: Characterization of cell-free translation products of mRNA from bovine ameloblasts by monoclonal and polyclonal antibodies. *Tooth Enamel IV* (Fearnhead, R. W., and Suga, S., eds) pp. 161-166, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 - 45) Rennard, S. I., Berg, R., Martin, G. R., Foidart, J. M. and Robey, P. G.: Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal. Biochem.* **104** : 205-214, 1980.
 - 46) Baba, T., Oida, S., Shimokawa, H. and Sasaki, S.: Determination of bovine enamel protein by enzyme-linked immuno-adsorbent assay. *Arch. Oral Biol.* **31** : 171-174, 1986.
 - 47) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685, 1970.
 - 48) Smith, B. J.: SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods in Molecular Biology*. Volume 1. Proteins. (Walker, J. M., ed) pp. 41-55, Humana Press, New Jersey, 1984.
 - 49) Gooderham, K.: High-sensitivity silver staining of proteins following polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in*

- Molecular Biology. Volume 1. Proteins. (Walker, J. M., ed) pp. 113-118, Humana Press, New Jersey, 1984.
- 50) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250** : 4007-4021, 1975.
 - 51) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76** : 4350-4354, 1979.
 - 52) Nikiforuk, G. and Gruca, M.: Immunological reactions of the organic matrix of developing bovine enamel. *Calcif. Tissue Res.* **4** : 129-135, 1969.
 - 53) Nikiforuk, G. and Gruca, M.: Immunological and gel-filtration characteristics of bovine enamel protein. *Tooth Enamel II* (Fearnhead, R. W., and Stack, M. V., eds) pp. 95-98, John Wright, Bristol, 1971.
 - 54) Elwood, W. K. and Apostolopoulos, A. X.: Analysis of developing enamel of the rat. III. Carbohydrate, DEAE-sephadex, and immunological studies. *Calcif. Tissue Res.* **17** : 337-347, 1975.
 - 55) Guenther, H. L., Croissant, R. D., Schonfeld, S. E. and Slavkin, H. C.: Identification of four extracellular-matrix enamel proteins during embryonic-rabbit tooth-organ development. *Biochem. J.* **163** : 591-603, 1977.
 - 56) Schonfeld, S. E.: Demonstration of an allo-immune response to embryonic enamel matrix proteins. *J. Dent. Res.* **54** : C72-C77, 1975.
 - 57) Schonfeld, S. E., Trump, G. N. and Slavkin, H. C.: Immunogenicity of two naturally occurring solid-phase enamel proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **155** : 111-114, 1977.
 - 58) Graver, H. T., Herold, R. C., Chung, T. Y., Christner, P. J., Pappas, C. and Rosenbloom, J.: Immunofluorescent localization of amelogenins in developing bovine teeth. *Dev. Biol.* **63** : 390-401, 1978.
 - 59) Fincham, A. G.: Amelogenins: Progress and problems. *Tooth Enamel IV* (Fearnhead, R. W., and Suga, S., eds) pp. 114-119, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 - 60) Slavkin, H. C., Zeichner-David, M., MacDougall, M., Bringas, P., Bessem, C. and Honig, L. S.: Antibodies to murine amelogenins: Localization of enamel proteins during tooth organ development in vitro. *Differentiation* **23** : 73-82, 1982.
 - 61) Nanci, A., Bendayan, M. and Slavkin, H. C.: Distribution of enamel protein antigens during mouse incisor amelogenesis as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Tooth Enamel IV* (Fearnhead, R. W., and Suga, S., eds) pp. 141-145, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 - 62) Christner, P. J., Lally, E. T., Ads, A. H. and Herold, R. C.: Production of a monoclonal antibody to bovine tooth enamel proteins. *Arch. Oral Biol.* **28** : 773-779, 1983.
 - 63) Christner, P. J., Lally, E. T., Miller, R. D., Leontzwich, P., Rosenbloom, J. and Herold, R. C.: Monoclonal antibodies to different epitopes in amelogenins from fetal bovine teeth recognize high-molecular-weight components. *Arch. Oral Biol.* **30** : 849-854, 1985.
 - 64) Rosenbloom, J., Lally, E. T., Dixon, M., Spencer, A. and Herold, R. C.: Production of a monoclonal antibody to enamelin which does not cross-react with amelogenins. *Calcif. Tissue Int.* **39** : 412-415, 1986.
 - 65) Yanagisawa, T., Nylen, M. U. and Termine, J. D.: Distribution of matrix components in hamster enamel-An electron microscopic study. *J. Dent. Res.* **60** (A) : 558, 1981.
 - 66) 柳澤孝彰, 田熊庄三郎: 超微構造的にみた琺瑯質の有機性基質と結晶の関係. *Jpn J. Oral Biol.* **24** : 777-787, 1982.