

原著

ヒト歯髄組織における骨形成タンパク質の発現

伊藤勝敏¹⁾、荒川俊哉²⁾、村田 勝¹⁾、田隈泰信²⁾、有末 眞¹⁾

¹⁾北海道医療大学歯学部 生体機能 病態学系顎顔面口腔外科学分野 061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

²⁾北海道医療大学歯学部 口腔生物学系生化学分野 061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

(受理: 2007年9月18日)

抄録: 歯髄は近年、硬組織や神経組織の再生に利用可能な生物資源として注目されるようになってきた。本研究では、ヒト歯髄における BMP の mRNA とタンパク質の発現状態を調べた。成人の第三大臼歯から摘出した歯髄の全 RNA を用いて RT-PCR をおこなったところ BMP-2, -4, -6, -7 mRNA の発現が認められた。加えて硬組織関連遺伝子である alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), dentin sialoprotein (DSP), および dentin matrix protein 1 (DMP1), mRNA の発現も認められた。

一方、歯髄の SDS 溶解液に対し抗 BMP-2 抗体を用いて免疫ブロット解析したところ、分子量 50 kDa のメインバンドと、32 ないし 16 kDa の位置にマイナーバンドが現れた。そこで FLAG 標識した BMP-2 の融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、COS-7 細胞に発現させた。COS-7 細胞の SDS 溶解液は、抗 FLAG 抗体と抗 BMP-2 抗体を用いた免疫ブロット解析の結果、どちらも 62 kDa にメインバンドが検出された。これらの結果は、抗 BMP-2 抗体がヒト BMP-2 を特異的に認識すること、そして生理的なヒト歯髄組織において、BMP-2 の大部分は分子量 50 kDa の高分子量前駆体として存在することを示唆している。そこで FLAG 標識した BMP-2 の融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、COS-7 細胞に発現させた。COS-7 細胞の SDS 溶解液は、抗 FLAG 抗体と抗 BMP-2 抗体を用いた免疫ブロット解析の結果、どちらも 62 kDa にメインバンドが検出された。これらの結果は、抗 BMP-2 抗体がヒト BMP-2 を特異的に認識すること、そして生理的なヒト歯髄組織において、BMP-2 の大部分は分子量 50 kDa の高分子量前駆体として存在することを示唆している。

Expression of Bone morphogenetic proteins (BMPs) in human dental pulp

Katsutoshi Ito¹⁾ Toshiya Arakawa²⁾ Masaru Murata¹⁾ Taishin Takuma²⁾ Makoto Arisue¹⁾

¹⁾Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, Health Sciences University of Hokkaido 1757 Kanazawa, Tobetsu, Hokkaido, 061-0293

²⁾Division of Oral Biology, Department of Biochemistry, Health Sciences University of Hokkaido, 1757 Kanazawa, Tobetsu, Hokkaido, 061-0293

Abstract: Dental pulps have recently been recognized as potential bio-resources for the regeneration of mineralized and neuronal tissues. In this study we estimated the expression of mRNA and protein of bone morphogenetic proteins (BMPs) in human dental pulps. The dental pulps, which were obtained from adult third molars, showed the expression of BMP-2, -4, -6, and -7 mRNAs by RT-PCR. In addition, the mRNA expressions of other hard tissue-related proteins, such as alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), dentin sialoprotein (DSP), and dentin matrix protein 1 (DMP1), were detected by RT-PCR. The lysate of human dental pulps gave a main band at 50 kDa and several minor bands at 32 to 16 kDa by immunoblotting with anti-BMP-2 antibody. The construct of human BMP-2 with FLAG epitope was prepared, and the fusion protein was expressed in COS-7 cells. The FLAG-tagged BMP-2 gave an identical band at 62 kDa by immunoblotting using both anti-FLAG and anti-BMP-2. These results suggest that anti-BMP-2 is highly specific to human BMP-2, and that BMP-2 is mainly present as an immature high molecular weight precursor in normal, adult dental pulps.

Key words: bone morphogenetic proteins, BMP-2, human, dental pulp, regeneration

表 1 PCR プライマー

Gene	Sequence	annealing()
BMP-2:	forward 5'- CCCCTACATGCTAGACCTGTATC - 3' reverse 5'- TGACATCAAAACTTTCCACC - 3'	52.0
BMP-4:	forward 5'- GTCGTTTTATTATGCCAAGTCC - 3' reverse 5'- AAAGAGGAAACGAAAAGCAGAG - 3'	52.0
BMP-6:	forward 5'- GAGAATGCTCCTTCCCCTCAAC - 3' reverse 5'- TGGCATCCACAAGCTCTTACAAC - 3'	56.0
BMP-7:	forward 5'- CGCTTCGACAATGAGACGTTTC - 3' reverse 5'- TGGCGTTCATGTAGGAGTTCAG - 3'	56.0
ALP	: forward 5'- CGCCTACCAGCTCATGCATAAC - 3' reverse 5'- GTCAATTCTGCCTCCTCCACC - 3'	58.0
OCN	: forward 5'- AGCCTTTGTGTCCAAGCAGGAG - 3' reverse 5'- AAGGGGAAGAGGAAAGAAGGGTG - 3'	56.0
OPN	: forward 5'- ACCCATCTCAGAAGCAGAATCTCC - 3' reverse 5'- CACCATTCAACTCCTCGCTTTCC - 3'	58.0
DSP	: forward 5'- CCATTCCAGTTCCTCAAAGCAAACC - 3' reverse 5'- CAGCGACATCCTCATTGTGACC - 3'	58.0
DMP 1:	forward 5'- ATCCTGTGCTCTCCCAGTAACC - 3' reverse 5'- CTCATTGTCAAGTTCCTGCTCTC - 3'	58.0

緒言

近年、骨髄幹細胞を使用した組織再生研究が急速に発展しつつある¹⁾。2003年、ヒト成人歯髄組織に多分化能をもった幹細胞の存在が確認されて以来²⁾、歯髄組織は、象牙質の修復や歯周病による骨欠損の回復に有益であるばかりでなく³⁾、脳神経外科領域における神経再生研究を含めた再生医療全般においても注目されるようになってきた。

歯髄組織は、歯の形成・維持にきわめて重要な働きをしている。正常ヒト歯髄組織は、象牙前質に接する象牙芽細胞層から内部に向かって細胞希薄層、細胞稠密層、歯髄細胞の順に配列され、血管や神経の豊富な組織である。歯の形態形成が終了した後、歯髄組織は象牙芽細胞からの知覚を神経を介して脳へ送ることにその役割を移し、硬組織形成活性は休眠状態に入ると考えられている。しかし、歯髄組織は、加齢や咬合圧などの間接刺激により第二象牙質を形成し、齲蝕などの直接刺激によりdentin bridgeのような第三象牙質を形成する。他方、イヌやウサギの歯髄を用いた異所性移植実験において、骨や骨様象牙質が形成されること^{4,5)}、さらにラット歯髄を象牙質・歯髄複合体として、あるいはシリコンチューブに入れた状態で筋肉内に自家移植すると、象牙細管を有する象牙質が形成されることが報告された⁶⁾。こうした歯髄組織の硬組織誘導現象には、骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic proteins : BMPs) の関与が示唆されている。

BMP は、Transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーに属し、骨誘導の他、胚発生にも関与する多機

能性の成長因子である⁷⁾。BMPは、セリン/スレオニン・キナーゼ活性をもつ受容体を介してSmadをリン酸化し、リン酸化されたSmadが核に移行して標的遺伝子の発現を調節することが知られている⁸⁾。1988年ヒトBMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4のcDNAがクローニングされ⁹⁾、その一次構造が明らかになった。その後、遺伝子組換え技術の発達によりリコンビナントのヒトBMP-2の生産が可能となり、2002年アメリカ合衆国ではFDA(食品医薬品局)の認可によりBMP-2の臨床応用が開始された。

歯髄のBMP研究では、1994年ヒト歯髄由来の培養細胞にBMP-2, BMP-4, BMP-6のmRNA発現がはじめて報告された¹⁰⁾。1996年培養していないヒト歯髄組織においてもBMP-2, BMP-4, BMP-7(OP-1)のmRNA発現が確認された¹¹⁾。しかし、タンパク質レベルでの研究はほとんどおこなわれていない。本研究では、ヒト歯髄組織におけるBMPのmRNAおよびタンパク質の発現、ならびに硬組織関連遺伝子の発現について解析した。

材料および方法

1 ヒト歯髄組織の採取

本研究は、北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受けた。実験に使用した歯は、年齢20歳から30歳までの男女上下顎第三大臼歯の健全歯およびC₁の齲蝕歯である。これらの抜去歯は、北海道医療大学病院ならびに北海道医療大学歯科内科クリニックにおいて、インフォームドコンセントを受けた患者より供与された。歯は

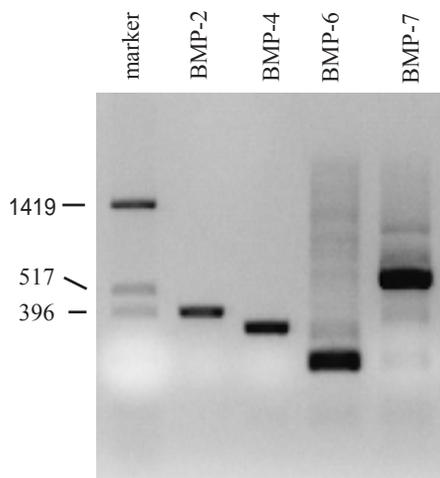


図1 ヒト歯髄組織における BMP mRNA の発現

ヒト歯髄組織の total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 の検出を行った(35 サイクル増幅)。BMP-2(403 bp), BMP-4(398 bp), BMP-6(210 bp), BMP-7(570 bp) の発現が認められた。

抜去後迅速に -80 で凍結し、歯髄摘出まで保存した。歯髄摘出時、注水下でタービンダイヤモンドバーを用いて歯冠歯根の歯軸方向に楔を形成し、歯髄に損傷を与えないように骨ノミで分割した。

2 全 RNA の抽出と cDNA の調整

全 RNA は、摘出したヒト歯髄組織から TRIzol Reagent® (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) を用いて、抽出した。DEPC 水に溶解した RNA は NanoDrop ND-1000 spectrophotometer® (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.) を用いて定量し、1µg の total RNA, SuperScript III® (Invitrogen) を用いて逆転写反応(RT)をおこない cDNA を調製した。

3 PCR

PCR は、ヒト歯髄の RT 産物を鋳型とし、耐熱性 polymerase として Platinum Taq® (Invitrogen) および KOD plus® (TOYOBO, 大阪) を用いておこなった。PCR に使用したプライマーと annealing 温度を表 1 に示す。BMP-2, BMP-4, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), dentin sialoprotein (DSP), dentin matrix protein 1 (DMP1) には、Platinum Taq® を、BMP-6 と BMP-7 は KOD plus® を用い、35 サイクルでおこなった。PCR 産物は、135V、15 分間、エチジウムブロマイドを含む 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し、DNA バンドは LightCapture® (ATTO, 東京) で検出した。

4 ウェスタンブロッティング

摘出したヒト歯髄組織を、還元剤を含む SDS sample buffer 100µl に溶解し、5 分間煮沸した。煮沸したサンプル 20µl を、5-20% のグラディエントゲル (e-PAGEL, ATTO) を用いて電

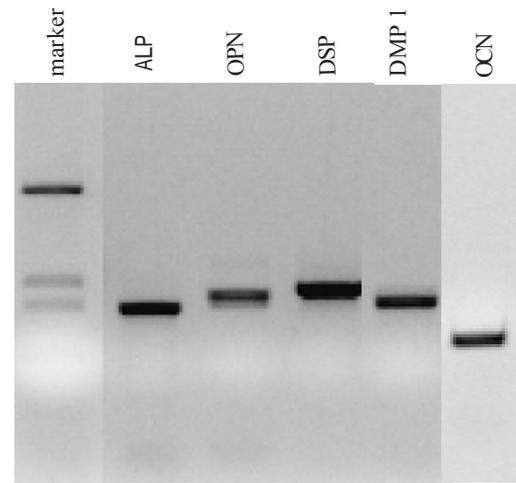


図2 ヒト歯髄組織における硬組織関連遺伝子の発現

ヒト歯髄組織の total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、ALP (alkaline phosphatase), OPN (osteopontin), DSP (dentin sialoprotein), DMP 1 (dentin matrix protein 1), OCN (osteocalcin) の検出を行った(35 サイクル増幅)。ALP (400 bp), OPN (420 bp), DSP (489 bp), DMP 1 (427 bp), OCN (276 bp) の発現が認められた。

気泳動し (30 mA, 55 分)、泳動終了後にタンパク質を PVDF 膜 (BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A.) に転写した (100mA, 60 分)。転写した PVDF 膜は Block Ace® (雪印乳業 - 大日本製薬、東京) を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。一次抗体として 500 倍希釈した抗 BMP-2 抗体 (R&D, Minneapolis, MN, U.S.A.) を室温で 2 時間反応させ、0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) を用いて 10 分間洗浄を 3 回おこなった。二次抗体には 10000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (Amersham, NJ, U.S.A.) を室温で 1 時間反応させ、PBST を用いて同様に 10 分間洗浄を 3 回おこなった。免疫反応は ECL™ plus (Amersham) と LightCapture® を用いて検出した。

5 FLAG-BMP-2 発現ベクターの構築

BMP-2 の全長 cDNA は、歯髄組織の total RNA より RT-PCR 法を用いて増幅した。プライマーとして forward primer; 5'-CGGGATCCATGGTGGCCGGACCCGCTGTC-3 および reverse primer; 5'-GGAATTCGCGACACCCACAACCCTCCAC-3 を用いた。増幅した BMP-2 の cDNA を Bam H と EcoR の二つの制限サイトで切断し pIRES-hrGFP-1a ベクター (Stratagene, CA, U.S.A.) に組込んだ。精製したプラスミドを、リン酸カルシウム法で COS7 細胞に導入後、24 時間インキュベートした。COS7 細胞に発現した FLAG 標識 BMP-2 について、抗 BMP-2 抗体と抗 FLAG 抗体 (SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A) を用いて解析した。

結果

1 ヒト歯髄中の BMP および硬組織関連遺伝子の発現

ヒト歯髄組織より抽出した total RNA を用い、RT-PCR 法により BMP および硬組織関連遺伝子の発現を検討した。その結果、ヒト歯髄組織には BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 お

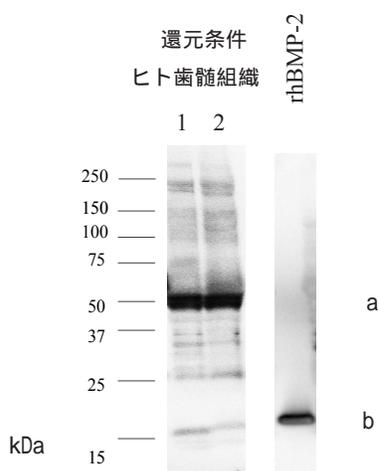


図3 ウェスタンブロットング法によるヒト歯髄組織のBMP-2の検出

ヒト歯髄組織では(lane 1,2)、抗BMP抗体と反応するメインバンドが50kDa(矢印a)に、弱いシグナルが34kDa、25kDa、16kDaの位置に検出された。一方、リコンビナントヒトBMP-2は、還元条件により二量体のs-s結合が切れるため、シグナルは16kDa(矢印b)の位置に存在していた。

よび硬組織関連遺伝子であるALP, OPN, OCN, DSP, DMP-1のmRNAが確認された(図1および図2)。

2 歯髄組織におけるBMP-2タンパク質の発現

歯髄組織のSDS溶解液を電気泳動後、抗BMP-2抗体を用いてウェスタンブロットング解析を行なった結果、強いシグナルを示すバンドが50kDaの位置に、弱いバンドが32kDa, 25kDa, 16kDaの位置に検出された(図3左lane 1,2)。

3 FLAG標識BMP-2タンパク質の発現

FLAG発現ベクターに、ヒトBMP-2 cDNAを組み込み、FLAG-BMP-2融合タンパク質をCOS-7細胞で発現させた。COS-7細胞とヒト歯髄組織のSDS溶解サンプルを泳動後、抗FLAG抗体および抗BMP-2抗体を用いてウェスタンブロットングを行った(図4)。抗FLAG抗体を用いた場合、COS-7細胞では、62kDaの位置に強いバンドが検出された(図4右パネル)。他方、抗BMP-2抗体を用いた場合には、62kDaの同じ位置に強いシグナルのバンドが、30kDa付近に弱いバンドが検出された(図4左パネル)。ヒト歯髄組織では、図3と同様に、抗BMP-2抗体によって50kDaの位置にメインバンドが、32、25、16kDaの位置に弱いバンドが検出された(図4左パネル)。

考察

1 ヒト歯髄組織におけるBMPおよび硬組織関連遺伝子の発現

ヒト歯髄細胞におけるBMP発現は、1994年TakedaらによりBMP-2, BMP-4, BMP-6のmRNAがノーザンブロット

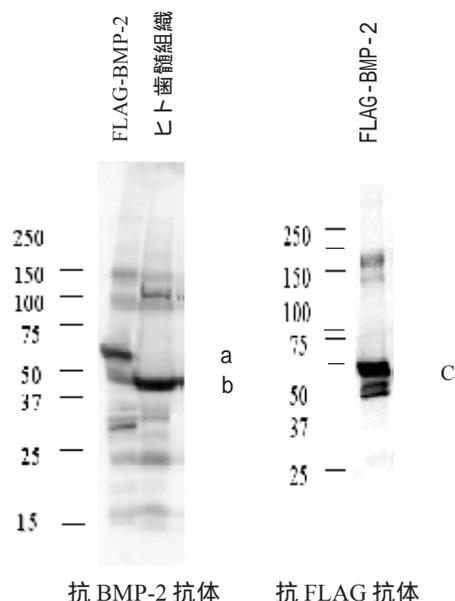


図4 FLAG-BMP-2融合タンパク質の発現と抗BMP-2抗体の特異性の検証

ヒトBMP-2の全コーディング領域を組み込んだpIRES-hrGFP-1aベクターをCOS7細胞に導入し、FLAGとの融合タンパク質を発現させた。発現した融合タンパク質を抗BMP-2抗体および抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロットングをおこなった。抗BMP-2抗体では、融合タンパク質に対しては62kDa(矢印a)、ヒト歯髄組織に対しては50kDa(矢印b)のバンドがそれぞれ検出された。抗FLAG抗体を用いた場合は、融合タンパク質においては、抗BMP-2と同じく、62kDa(矢印c)のバンドが検出された。

法で初めて確認された¹¹⁾。しかし、これは歯髄組織から分離した培養細胞において同定されたものであり、培養していないヒト歯髄組織では、1996年Smokeらにより、BMP-2, BMP-4, BMP-7(OP-1)の発現と、その受容体であるBMP receptor-I(BMPR-I)、およびBMP receptor-II(BMPR-II)の存在がPCRによって確認されている¹¹⁾。PCRを用いた同様の報告は2000年と2003年にもなされている^{12), 13)}。

本研究では、ヒト成人歯髄組織の全RNAからRT-PCRによって、BMPファミリー15種のうち4種のBMP(BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7)のmRNAが確認された(図1)。また歯髄にはALP, OPN, OCN, DSP, DMP-1といった硬組織関連遺伝子も発現していた(図2)。八重柏ら¹²⁾は、歯周炎罹患の程度によって、歯髄のBMP-2, BMP-4, OCNのmRNA発現に差異が認められないことから、歯周組織の状態は歯髄石灰化に関係せず、影響をおよぼす要因として年齢、カリエス、修復物、咬耗等を示唆している。また、藤原ら¹³⁾は、培養歯髄細胞では培養初期にALP活性とBMP-2およびBMP-4のmRNA量が上昇し、その後石灰化が進行すると報告している。さらに、培養歯髄細胞においては、塩化カルシウムの添加量と平行してBMP-2, ALP, OPNの各mRNA量が増加することが報告された¹⁴⁾。これらの知見は、歯髄細胞の硬組織形成能が環境の変化により、活性化されることを示している。

2 ヒト歯髄組織における BMP タンパク質の発現と骨再生材料としての可能性

BMPは50kDaの前駆体として合成され、プロセッシングによってN末端から段階的に切断され活性をもった成熟体となる¹⁵⁾。このプロセッシングは Furin, PC6, PACE といったPC familyに属するエンドプロテアーゼによって行われることが明らかになっている¹⁶⁻¹⁸⁾。Furinはアミノ酸配列上の-RXR /KR -または、-RXXR -を切断する¹⁹⁾。BMP-2には、切断可能箇所が1次構造上に6カ所存在し、数段階のプロセッシングを経て、最終的に16 kDaのポリペプチド鎖の二量体からなる成熟型 BMP-2 が形成される。

歯髄組織におけるBMPタンパク質の存在状態を知る目的で、抗BMP-2抗体を用いてウェスタンブロットングをおこなったところ、50kDaの位置にメインのバンドが、また32, 25, 16 kDaの位置にマイナーバンドが認められた(図3)。ウェスタンブロットングで検出された50kDaのバンドがBMP-2の前駆体であること確認するため、FLAG-BMP-2融合タンパク質をCOS-7細胞に発現させ、抗BMP-2抗体の特異性を検討した。ウェスタンブロットングの結果、図4に示すように、抗BMP-2、抗FLAGともに62kDaの位置に強いシグナルが検出された。この結果は、今回用いた抗BMP-2抗体が、BMP-2に対して高い特異性を有することを示すものであり、歯髄で検出された50kDaのバンドは、BMP-2の前駆体であることが強く支持された。これはXenopusを使った発現実験で、BMP-2, BMP-4, BMP-7が前駆体の状態で存在することが報告され、その大きさは本結果と同じ50kDaと一致している^{17, 20)}。弱いシグナルはCOS-7細胞の発現タンパク質にも歯髄組織と同様にみられたが、これは、COS-7細胞にもプロセッシング酵素が存在するためと考えられる。これらの結果より、生理的歯髄組織においては、BMP-2は主に高分子量の前駆体として存在していることが示唆された。今後、第二・第三象牙質を誘導した歯髄組織における成熟型の割合や歯髄を培養した場合の変化について検討される必要があるだろう。

結語

本研究では、成人第三大臼歯歯髄を対象にして、以下の結果と結論が得られた。

1. ヒト歯髄組織には、BMPファミリー遺伝子のうちBMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7の発現が認められ、また、硬組織関連遺伝子であるALP, OPN, OCN, DSP, DMP-1も発現していた。
2. 抗ヒトBMP-2抗体を用いたウェスタンブロットングの結果、ヒト歯髄組織中のBMP-2は、主として50kDaの前駆体として存在していた。

以上の結果より、ヒト歯髄組織には4種類のBMPと硬組織関連遺伝子の発現が認められたが、BMP-2タンパク質は主に前駆体の状態で存在しており、生理的状態の歯髄組織は石灰化に関して休眠状態にあることが示唆された。

本研究は北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科博士課程学位論文であり、また平成18年度第51回口腔外科学会総会でゴールドリボン賞を受賞した。

参考文献

1. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma SD, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436, 2001
2. Shi S, Gronthos S: Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18: 696, 2003
3. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S: The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 8: 191-199, 2005
4. Yamamura T, Shimono M, Koike H, Terao M, Tanaka Y, Sakai T, Inoue T, Yoshiki S, Tachikawa T, Kawahara H, Watanabe O: Differentiation and induction of undifferentiated mesenchymal cells in tooth and periodontal tissue during wound healing and regeneration. *Bull Tokyo dent Coll*: 21, 181-221, 1980
5. Inoue T, Tanaka Y, Shimono M, Yamamura T: Osteogenic activity of transplanted dental pulp. *JPN J Oral Biol*: 26, 1344-1346, 1984
6. 下野正基: 象牙質様硬組織の誘導. *歯医学誌*: 15 : 128-135, 1996
7. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965
8. Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z: Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci*. Jan 1: 349-358, 2004
9. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534, 1988
10. Takeda K, Oida S, Ichijo H, Imura T, Maruoka Y, Amagasa T, Sasaki S: Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. *Bone* 15: 467-470, 1994
11. Gu G, Smoke RH, Rutherford RB: Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 41: 919-923, 1996
12. 八重柏隆 佐藤貴彦 矢管隆利 菊池隆 藤本淳 藤本梓 遠藤憲行 菅原教修 上野和之: 歯髄細胞の石灰化に関連する遺伝子発現について(抄). *日歯保存誌* 2000年秋期特別号; 43: 46
13. 藤原英明 佐藤貴彦 藤本淳 佐藤俊介 和田務 八重柏隆 國松和司: 歯髄細胞の骨形成関連遺伝子の

伊藤勝敏 ほか：ヒト歯髄の骨形成タンパク質

- mRNA の経時的変化 (抄) . 日歯保存誌 2003 年秋期特別号; 46 : 200
14. Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, Ogawa T, Kawaguchi H, Kurihara H: The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endodo* 29: 104-107, 2003
 15. 遠藤彌重太 : 蛋白質合成システム. 蛋白核酸酵素 38 : 1062- 1074, 1993
 16. Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL: BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17: 4735-4743, 1998
 17. Degrin C, Jean F, Thomas G, Christian JL: Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* 15: 5012-5020, 1996
 18. Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T, and Fuller RS: Precursor processing by kex2/furinprotease. *Chem Rev* 102: 4525-4548, 2002
 19. Thomas G: Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 753-766, 2002
 20. Cui Y, Hackenmiller R, Berg L, Jean F, Nakayama T, Thomas G, Christian JL: The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* 15 : 2797-2802, 2001.