

**LEMBAR PENGESAHAN  
KEGIATAN PENELITIAN DOSEN**

Judul Penelitian : **Identification the candidate of SP6-interacting molecules**  
(In tooth development and amelogenesis)

Peneliti : drg. Arya Adiningrat, Ph.D

NIK/NIDN : 19840923201510 173 143/0523098401

Tema penelitian : Tooth regeneration

Bidang tema : Oral biochemistry and molecular biology

Afiliasi : Prodi KG FKIK UMY

Waktu penelitian : 25 Oktober – 21 Desember 2016

Tempat penelitian : Dept. Oral biochemistry and molecular biology, Faculty of  
Dentistry, Tokushima University, Japan.


Biaya penelitian : Fujii Otsuka scholarship

Menyetujui,  
Sek. Prodi KG FKIK UMY



drg. Erma Sofiani, Sp. KG  
NIK:19741022200810173087

Bantul, 26 Agustus 2017  
Peneliti,



drg. Arya Adiningrat, Ph.D  
NIK:19840923201510173143



FACULTY OF DENTISTRY  
**TOKUSHIMA UNIVERSITY**  
18-15, 3 Kuramoto-cho, TOKUSHIMA, 770-8504, JAPAN

## LETTER OF INVITATION

Dear Dr. Arya Adiningrat,

I am delighted to extend an official invitation to you to Faculty of Dentistry, Tokushima University as a Foreign Researcher in accordance with the details specified below.

1. Period of invitation:  
From October 25, 2016 to December 21, 2016
2. Research subject:  
Tooth Regeneration
3. Host professor:  
Prof. Takafumi Noma, MD., PhD.
4. Financial source for travel expenses and accommodation:  
Fellowship fund for Foreign Researchers from Fujii Otsuka  
Fund for International Education and Research Exchanges

We are looking forward to your visit.

August 5, 2016



OFFICIAL SEAL

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fumiaki Kawano'.

Fumiaki Kawano  
Dean  
Faculty of Dentistry  
Tokushima University

Fujii-Otsuka International Education and Research Exchange Fund  
藤井・大塚国際教育研究交流資金

Research Report  
研究報告書

Date 22 December 2016

(提出年月日)

Name of foreign researcher:

(招へい研究者氏名)

Arya Adiningrat, D.D.S., Ph.D

Name of host professor:

(受入研究者氏名)

Prof. Takafumi Noma, M.D., & Ph.D

Research period:

(研究期間)

From 24 October 2016 to 22 December 2016

Subject of the research in Japan:

(滞日中の研究)

Tooth Regeneration

Researcher signature

(署名)

Report Description:

Stem-cells based regenerative therapy is one of promising alternative organ replacement therapy in the future. There are several approaches that can be applied on this technology

IPS-cells utilization also one of Stem-cells derived regenerative therapy technology which also support wider application in regenerative therapy and organ replacement.

In order to regenerate tooth using IPS-cells, several signaling cues are required for inducing proper tooth regeneration. Therefore, the understanding of molecular mechanism is inevitable.

SP6 is one of critical molecules for proper tooth development, truncated form of SP6 due to frameshift mutation exhibit specific phenotypical defect of Amelogenesis imperfecta, while SP6 transgenic rat showed yellowish tooth and accumulation of iron deposition in addition to the phenotype of delayed ameloblast maturation histopathologically. These evidences suggested the critical role of SP6 during tooth development

---

My studies utilize G5 cells-dental epithelial derived cells, suggested the possible existence of dynamic and tight control of SP6 in the cellular context, since SP6 is very short-lived protein in G5 cells due to proteasomal degradation machinery. It also suggested the possibility of several co-regulators or binding-partner to exhibit the dynamic controlling mechanism of SP6.

---

Currently, there are limited information about SP6 binding partner or interacting molecules. Therefore, on this research I want to investigate the possibility for SP6 interacting molecules further.

---

On this study, I utilized SP6 stable transformant-cells which constitutively express SP6 and also derived from dental epithelial cells. After confirming and selecting the highest SP6 producer cells, I confirmed the expression of several candidate molecules for positive control and also prepared the nuclear extract fractionation.

---

In order to enrich the SP6 transcription expression, I planned to utilize nuclear extract sample. Surprisingly, I found interesting result related to SP6 localization under the cells-stress environment which maybe induced by proteasomal inhibitor. This finding also suggested some other possibility for SP6-down target genes regulation by SP6 in over-expression condition.

---

Furthermore, still the co-partner or SP6 possible interacting molecules is required to be investigated. Therefore, I did in vivo cross-linking procedure to fixate the complex molecules before performing immunoprecipitation. My initial cross-linking procedure showed some aggregated molecules complex was occurred within my sample compare to the non-crosslinked sample. Using this material, I further analyze by immunoprecipitation procedure to enrich the obtained crosslinked sample for targeting molecules complex.

---

Since our starting material are SP6 stable transformant cells, and this SP6 was already contain HA-tag. Then, we proceed the pilot immunoprecipitation procedure using anti-HA high affinity antibody and confirm the result by different HA-probe antibody in addition to anti SP6 antibody for the identity.

---

By 22th December 2016, I have already done until this initial immunoprecipitation procedure. However, in order to conclude the identity of possible SP6 interacting molecules, further experimental procedures are required.

---

藤井・大塚国際教育研究交流資金による研究実施報告書



事業名：外国人研究者招へい事業（短期）

滞在期間：平成 28 年 10 月 22 日～平成 28 年 12 月 24 日

研究題目：歯の再生実用化研究

招聘者名：Arya Adiningrat

招聘者所属：インドネシアムハマディア大学医学健康科学部（講師）

申請者：野間隆文

申請者所属：徳島大学大学院医歯薬学研究部

1. 研究目的：歯の再生を実現するために必要な歯の発生過程の分子メカニズムを明らかにし、iPS 細胞を用いた再生治療の技術開発に繋げる。
2. 諸言：現在幹細胞を用いた歯の再生治療は補綴物や義歯に置き換わる理想的な治療と期待されている。我々のグループは既にヒトの口腔粘膜より世界で始めて iPS 細胞を樹立し、歯の再生に取り組んでいる。今回の Arya Adiningrat 博士を招聘し、共同研究により、歯の再生を実現するために必要な歯の発生過程の分子メカニズムを明らかにすることとした。
3. 結果と考察：
  - 1) 転写因子 Sp6 過剰発現株の選抜  
Sp6 形質転換細胞株の中から、MG132 で Sp6 を高発現を誘導できるクローン C9y 細胞を選抜できた。
  - 2) 免疫沈降反応系の確立  
Sp6 タンパク質と相互作用し、Sp6 の活性を制御する分子を見出すために、免疫沈降反応とそれに引き続く mass 解析を実施するために、まず免疫沈降を確立することを試みた。購入可能な抗体（抗 HDAC1 抗体、抗 Msx2 抗体、抗 Pin1 抗体、抗 p300 抗体）を準備し、それぞれ Western blot 法により抗体の検出能力を評価した結果、4 種類のコントロール抗体のうち、1 種類（抗 HDAC1 抗体）が使用できることが確認できた。
  - 3) 核抽出液の分離と確認  
Sp6 タンパク質と相互作用する標的タンパク質を同定するために、まず、核抽出液の精製方法を確立した。
  - 4) クロスリンキング解析
    - ①予備実験  
Sp6 過剰発現クローンの細胞抽出液を用いて、クロスリンカー(DSS)による クロスリンキング反応を行った。陽性コントロールとして $\beta$ -actin 量が若干減少することをもって、クロスリンクが上手く反応していると判断した。
    - ②Sp6 サンプルを用いた免疫沈降・クロスリンク反応  
予備実験からクロスリンク反応が良好に行なわれていると判断されたことから、免疫

藤井・大塚国際教育研究交流資金による研究実施報告書

沈降反応とそれに引き続く、クロスリンク反応, Western blot 法による検出の一連ステップを行なった。実験結果として、クロスリンクしたサンプル中に Sp6 に結合したタンパク質の存在が示唆される Sp6 より大きい分子量の複合体が存在することが示唆された。(12月22日現在)

5) 今後の課題

今回の研究活動では、クロスリンクするタンパク質の存在が示唆されたところで研究期間の終了を迎えた。今後、得られた結果の再現性を確認した上で、Mass 解析により、分子同定へステップを進める予定である。

4. 引用文献：

1) Isolation and characterization of dental epithelial cells derived from amelogenesis imperfecta rat. Arya Adinningrat et al., Oral Dis. 22, 132-139, 2016.

2)

5. 謝辞：この度の短期受け入れに際しては、藤井大塚国際教育研究交流資金より支援を頂きました。関係者の皆様に、心から感謝申し上げます。

6. 附記：研究の一部は International Symposium “Oral and Craniofacial Development and Disease 2016” において、共同演者として発表した。

7. コメント：研究指導者として、短期間の共同研究ではあったが、想定以上の研究成果をあげることが出来たと評価している。Arya 博士の研究成果を踏まえ、当分野において、引き続き研究を進めて、歯の再生の実現に貢献したいと考えている。



クロスリンク実験で Sp6 結合タンパク質を検出しようとして、慎重にサンプルを確認している実験風景。



FACULTY OF DENTISTRY  
GRADUATE SCHOOL OF ORAL SCIENCES  
TOKUSHIMA UNIVERSITY



徳島大学歯学部・大学院口腔科学教育部  
徳島大学歯学部 〒770-8504 徳島市蔵本町3丁目18番地の15

## CERTIFICATE OF APPRECIATION

This is to certify that,

**Arya Adiningrat, D.D.S., Ph.D**

(Lecturer from the Dental School of Medicine and Health Sciences Faculty,  
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Indonesia)

Had fulfilled our research program as a short-term post-doctoral research under the field of **Tooth Regeneration**, from **October 24<sup>th</sup> to December 22<sup>th</sup>, 2016** in the Department of Oral Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Oral Sciences, Tokushima University, Japan.

Tokushima, December 22<sup>th</sup> 2016

Graduate School of Oral Sciences,  
Tokushima University

Dean,

*Fumiaki Kawano*



**Prof. Fumiaki Kawano, D.D.S., & Ph.D**