

아프리카산 발톱개구리의 치아형성띠 표지인자 *pitx2*의 발현

고병석, 홍지수, 박병건, 이영훈[†]

전북대학교 치과대학 구강해부학교실, 구강생체과학연구소

접수: 2019년 12월 13일/ 수정접수: 2019년 12월 25일/ 게재 승인: 2019년 12월 25일/ 출간: 2019년 12월 31일

치아의 발달은 치아판(dental lamina)의 형성으로부터 시작하고, 이어서 치배(tooth germ)는 모양에 따라 치아원기(dental placode)와 모자시기(cap stage), 종시기(bell stage)로 발달한다. 치아판은 치아를 형성하는 줄기세포(stem cells)로 알려져 있고, 비포유동물의 치아판에서 1차 치아(primary tooth)뿐만 아니라 계승치아가 형성되는 것으로 보고되고 있다. 치아판에서 발현되는 유전자의 발현들이 설치류와 어류, 파충류, 조류에서 보고되어 있지만, 양서류의 치아형성 과정에서 *pitx2*의 발현은 잘 알려져 있지 않다. 이 연구에서 양서류의 치배형성과정에서 *pitx2*의 발현양상을 확인하기 위해 아프리카산 발톱개구리 올챙이의 위턱을 고정하여 whole mount in situ hybridization을 이용하였다. 아프리카산 발톱개구리의 위턱에서 치배는 stage 54부터, 치아바탕질은 stage 56부터 각각 형성되었고, 치배와 치아바탕질은 뒤코구멍의 앞쪽에서 나타나기 시작하여 안쪽과 먼쪽으로 치배와 치아바탕질이 형성되었다. *Pitx2*의 발현은 stage 54의 치아형성띠에서 발현되었고, stage 55부터 stage 57까지 *pitx2*의 발현은 타원형 또는 긴 삼각형으로 나타났다. *Pitx2*의 발현은 모자시기의 치배에서는 뚜렷하게 확인되었으나 종시기에서는 미약하였다. 이상의 결과로 아프리카산 발톱개구리에서 *pitx2*는 치아형성띠 표지인자이고, 치배형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

주제어: 아프리카산 발톱개구리, 치아형성띠, *pitx2* 발현

[†] 교신저자: 이영훈

전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, 전북대학교 치과대학 구강해부학교실

Tel: 82-63-270-4048, Fax: 82-63-270-4004, E-mail: yhlee@jbnu.ac.kr

서론

치아의 형성은 치아판(dental lamina)으로부터 시작하고, 이어서 치아판은 치아원기(dental placode)와 싹시기(bud stage), 모자시기(cap stage), 종시기(bell stage) 순서로 치배의 형태학적 변화를 거치면서 치아가 완성된다¹⁻²⁾. 치아를 형성하는 줄기세포 역할을 하는 치아판의 모양은 동물에 따라 차이를 나타내는데, 포유동물의 치아판은 치아상피의 안쪽에 형성된 중간엽으로 자라나는 구조이고³⁻⁴⁾, 어류와 파충류의 치아판은 치아상피가 두꺼워진 구조로 유지됨으로써 치아형성때(odontogenic band)라고 알려져 있다⁵⁻⁹⁾.

*Pitx2*는 생쥐와 들쥐(vole)의 치아사이틈(diastema)과 치아판에서 발현을 비교하는 연구에서 처음 보고되었고¹⁰⁾, 조류에서 두꺼워진 구강상피층이 확인되었고 이 부위에서 *pitx2*의 발현이 보고되었다¹¹⁾. *Pitx2*는 생쥐와 족제비(ferret), 파충류, 어류의 치아판 또는 치아형성때 표지인자로 알려진 *shh*와 발현양상을 비교하는 연구들이 보고되었다^{5-9,17-19)}. 종시기의 발달된 치배에서 *pitx2*는 *shh*와 다른 발현양상을 나타내었다^{12,13)}. 다양한 동물에서 연구된 *pitx2*와 *shh*는 치아판이 형성되기 이전에 치아활(dental arch)을 따라서 발현되었고, 치배가 형성되는 부위에서 그 발현이 확인됨으로써 치아를 유도하는 표지인자로 알려져 있다⁵⁻²²⁾. 치배발달과정에서 치아상피의 *Pitx2*는 FGF8에 의해 유도/유지(induction/maintenance)되고 BMP4를 억제하는 것으로 보고되었다^{23,24)}. 최근에 *pitx2*의 돌연변이를 가진 사람에서 *pitx2*는 치아형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다²⁵⁾.

치아발생과정에서의 *Pitx2*의 발현은 포유동물에서 처음 보고되었고, 어류와 파충류를 대상으로 진화와 관련된 연구에서 계승치아의 형성에 관한 연구에서 주로 알려져 있으나 양서류의 치아 발생 과정에서 *Pitx2*는 잘 알려져 있지 않다. 그러므로

이 연구에서 아프리카산 발톱개구리를 대상으로 치아형성과정에서 *Pitx2*의 발현양상은 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

아프리카산 발톱개구리의 알을 얻기 위해서 성숙한 암컷의 아프리카산 발톱개구리의 등쪽림프주머니(dorsal lymph sac)에 human chorionic gonadotropin (HCG, Sigma) 1,000 IU를 주사했다. 다음날 알을 수집하고, 수컷의 고환을 0.1 X normal amphibian medium (NAM) 용액에 넣어 잘게 자르고 상층액을 알에 뿌려 수정시켰다. 수정된 알을 0.1 X NAM 용액에 배양하여 Nieuwkoop and Faber²⁶⁾의 기준에 따라 stage 54, 55, 56, 57의 올챙이의 위턱을 MEMFA (0.1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde) 용액에 1시간 동안 실온에서 고정된 다음, 메탄올로 세척하였고, -20°C에서 1일 이상 보관하였다.

Total RNA 추출, *pitx2* plasmid DNA 및 cRNA 합성

Stage 59의 아프리카산 발톱개구리 올챙이의 위턱부위를 채취하여 RNA extraction kit (QIAGEN)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 아프리카산 발톱개구리의 *pitx2* (accession #NM_001088287.1) cDNA를 합성하기 위하여 primer (forward: 5'-ATGAACTCTATGAAAGAGCC-3', reverse: 5'-CACACGGGTCTGTTTACTGC-3')를 제작하였다.

각각의 primer와 total RNA (60ng/μl), One step RT-PCR kit (QIAGEN)에 포함되어 있는 5X

buffer와 dNTP, Enzyme mix를 혼합하여 reverse transcription 반응을 위하여 50° 에서 30분간 시행하고 95° 에서 PCR 활성화를 위해 15분간 시행하였다. 합성된 cDNA를 증폭하기 위해서 denaturing 과 annealing, synthesis의 과정을 94° C에서 1분, 55° C에서 1분, 72° C에서 1분 동안 35주기를 시행하였다.

RT-PCR에 의해서 얻어진 부산물을 pGEMT Easy vector (Promega, USA)에 삽입한 다음 DH5 α competent cells에 transformation을 하였다. pGEMT Easy vector에 삽입된 것을 확인하기 위하여 IPTG/ β -Gal 용액과 ampicillin이 포함된 LB agar에 DH5 α 100 μ l를 도포한 다음 14-16시간 동안 37° C에서 배양하였다. LB agar에서 흰색의 colony를 선택하여 3 ml의 ampicillin이 포함된 LB medium에서 배양한 다음 plasmid DNA를 정제한 후 sequencing 하였다. 이어서 얻어진 pGEMT Easy-pitx2 plasmid DNA를 ClaI으로 자른 다음 T7 polymerase로 cRNA antisense riboprobe를 합성하였다.

Whole mount in situ hybridization

냉동고 보관된 올챙이의 위턱을 증류수로 희석한 메탄올로 함수과정(hydration)을 거친 후, proteinase K (5 μ g/ml)를 PTw 용액(0.1% Tween-20, 1 X PBS)에 용해하여 1시간, 0.1 M triethanolamine 용액에 0.02% acetic anhydride로 희석하여 5분 동안 실온에서 처리하였고, PTw 용액으로 3.7% formaldehyde으로 희석한 후 재고정하였다. Digoxigenin으로 표지된 *pitx2* cRNA probe를 hybridization-용액으로 희석(0.5 μ g/ml)하여 60° C에서 14~16시간 동안 hybridization을 시행하였다.

이어서 hybridization 용액으로 10분간 60° C에서 세척하고 hybridization 용액과 2X SSC 용액을

1:1, 1:3으로 혼합하여 각각 10분씩 60° C에서 세척하였다. 이어서 alkaline phosphate-conjugated anti-digoxigenin antibody (1:2,000)를 이용하여 4° C에서 14시간 동안 면역반응을 실시하였다.

면역반응이 끝난 후에 세척하고 BM purple-alkaline phosphatase substrate (Roche)를 이용하여 빛을 차단한 다음 실온에서 14~16시간동안 발색하였고 10% 과산화수소 용액으로 표백하였다. 실체현미경(Leica MZ16, Swiss)을 이용하여 관찰한 다음 사진 촬영하였다.

결과

실체현미경 관찰 소견

수정 후 26일째 되는 stage 54에서 위턱의 오른쪽과 왼쪽에서 각각 2개씩의 치배가 관찰되었고 그 위치는 뒤코구멍(choanae)의 앞쪽과 안쪽에서 확인되었다(Fig. 1A-C). 수정 후 32일째 되는 stage 55에서 관찰된 치배의 수는 오른쪽과 왼쪽에서 각각 6개씩 확인되었고, 치배의 위치는 stage 54에서 확인된 치배의 안쪽(mesial)과 먼쪽(distal)으로 위치하고 있었다(Fig. 1D-F). 수정 후 38일째 되는 stage 56에서 관찰된 치배의 수는 오른쪽과 왼쪽에서 각각 10개씩 확인되었고, 치배의 배열은 입술의 가장자리와 나란하게 배열되었다(Fig. 1G-I). 형성된 치배에서 화살촉 모양의 치아바탕질(tooth matrix)이 뒤코구멍의 앞쪽과 안쪽에서 관찰되었다(Fig. 1G, I). 수정 후 41일째 되는 stage 57에서 관찰된 치배의 수는 오른쪽에서 11개, 왼쪽에서 13개로 확인되었고, 이 시기에 관찰된 치배들의 모양은 2가지로 관찰되었다. 하나는 치아바탕질이 이미 형성되었고 다른 하나는 이전 시기에 관찰된 치배와 유사한 모양이었으며 치배의 배열은 서로 다른 모양의 치배들이 번갈아가며 관찰되었다(Fig. 1J-L).

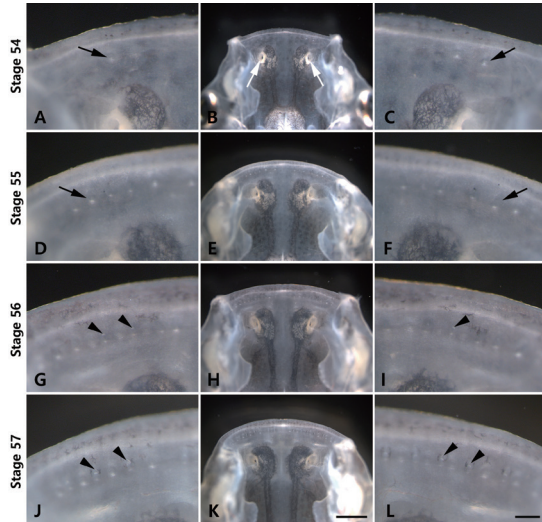


Fig 1. Stereomicroscopic photographs from stage 54 to stage 57 in the upper jaw of *Xenopus laevis*. At stage 54 (A-C) and 55 (D-F), the dental papillae of the tooth germs (arrow) are shown white dots (black arrow) anterior to the choanae (white arrow). At stage 56 (G-I) and 57 (J-L), the tooth matrix of the tooth germs are observed arrowhead (black arrowhead). scale bar in K = 25 μ m, scale bar in L = 100 μ m.

*Pitx2*의 발현양상

Stage 54에서 *pitx2*는 입술의 가장자리와 나란하게 치아형성띠(odontogenic band)의 모양으로 강하게 발현되었고, 뒤코구멍의 앞쪽에서 치아형성띠로부터 앞쪽으로 돌출된 *pitx2*의 발현이 관찰되었다(Fig. 2A). Stage 55에서 *pitx2*는 치배에서 강하게 발현되었고 그 모양은 대부분 타원형으로 관찰되었다. 치아형성띠는 치배의 뒤쪽에서 확인되었고 치아형성띠에서 *pitx2*의 발현은 미약하게 관찰되었다(Fig. 2B). Stage 56에서 *pitx2*는 치배와 치아형성띠에서 강하게 발현되었고 입술의 가장자리와 나란하게 형성된 치아형성띠의 폭은 넓게 관찰되었다. 치아형성띠의 앞쪽에서 관찰된 치배의 모양은 긴 삼각형과 타원형이었다(Fig 1C). Stage 57에서 치배의 모양은 긴 삼각형과 타원형으로 stage 56과 유

사하게 관찰되었고, 긴 삼각형의 치배는 stage 56의 치배보다 그 크기는 감소하였으며 *pitx2*의 발현도 미약하게 관찰되었다(Fig. 1D).

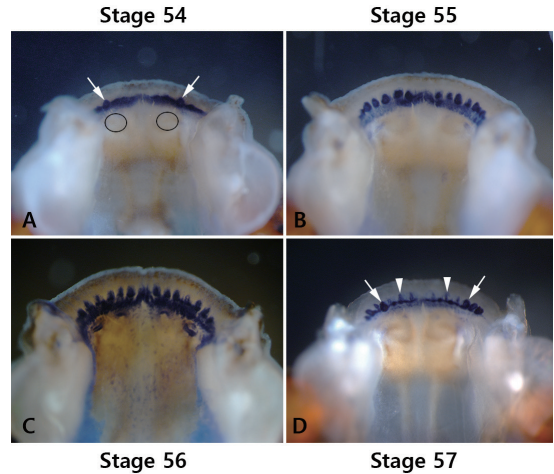


Fig 2. *Pitx2* expression in the upper jaw of *Xenopus laevis*. At stage 54 (A) *pitx2* is expressed in the odontogenic band and the tooth germ (arrow) anterior to the nose (black circles). At stage 55 (B) *pitx2* is expressed strongly in the tooth germ which is shown round shape, and weakly in the odontogenic band. At stage 56 (C) *pitx2* expression is observed strongly in the tooth germs and the odontogenic band. The tooth germs are shown triangular and round shapes. At stage 57 (D) *pitx2* is shown strongly in round tooth germs (arrowhead) and slender odontogenic band but weakly in triangular tooth germs (arrow).

고찰

치아형성띠(odontogenic band) 또는 치아판(dental lamina)은 발생기간에 일시적으로 형성되는 조직이고, 치아의 형성을 유도하는 줄기세포 역할과 치아의 위치를 결정하는 것으로 알려져 있다¹³. 치아형성띠와 치아판의 표지인자로서 *pitx2*는 다양한 동물에서 보고되었는데⁵⁻²² 생쥐와 들쥐(vole)에서 치아사이틈(diastema)은 앞니와 어금니에서처럼 치아판을 형성하지만 씹시기 초기에 세포

자멸사(apoptosis)로 소멸되는 조직이다¹⁰. *Pitx2*는 치아사이틈과 앞니, 어금니의 발생초기에 형성되는 치아판에서 발현되었고¹⁰, *pitx2*를 제거한 생쥐의 치배는 치아원기(dental placode) 상태로 더 이상 발달되지 않았으며¹⁴, *pitx2*는 줄기세포 표지인자 *sox2*와 *lef1*의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다^{15,16}. 조류의 아래턱에서 치아판은 형성되지만 치배 발생초기에 발달이 멈추었고 이 부위에서도 *pitx2*의 발현이 확인되었다¹¹. 생쥐와 조류의 치아판에서 발현되는 *pitx2*는 치아판이 발달하기 위해서 중간엽에서 발현되는 유전인자들과 상호작용이 필요할 것으로 보고되었다¹⁰⁻¹⁶.

계승치아의 발생이 주기적으로 반복되는 다생치아(polyphyodont)를 가진 비포유동물(non-mammalian)의 계승치아를 대상으로 치아재생에 관한 연구들이 보고되었는데^{5,9}, 어류에서 *pitx2*의 발현은 무지개송어의 치아형성띠와 치배에서 처음 보고되었다⁵. *Pitx2*는 치배의 바깥치아상피에서 발현되었고 바깥치아상피로부터 싹모양으로 자라나와 계승치아가 형성되었으며 이 부위에서도 *pitx2*의 발현이 관찰되었다⁶. 무지개송어의 *pitx2*의 발현은 인두와 입안에서 형성되는 치배에서 발현되었으나 치배가 발달하면서 인두의 치배에서 *pitx2*의 발현은 관찰되지 않았다⁷. 치아의 모양이 다른 3종류의 키클리드과의 어류에서 *pitx2*와 *shh*은 치배가 발생하기전 치아형성띠에서 발현되었고 이후 치배에서도 그 발현이 확인되었다⁸. 치배 사이에서 발현되는 *wnt7*이 *shh*의 발현을 억제함으로써 치아형성띠에서 치배의 형성기전이 보고되었다⁸. 무지개송어의 치아형성띠에서 *pitx2*와 *shh*의 발현이 확인되었지만 종시기의 치배에서 *pitx2*와 *shh*의 발현은 다르게 확인되었다. *Pitx2*는 바깥치아상피에서, *shh*은 안쪽치아상피에서 발현되었고 이러한 결과로써 바깥치아상피에서 *pitx2*의 발현이 계승치아를 유도하는 표지인자로서 역할을 하는 것으로 보고되

었다¹³.

이 연구에서 아프리카산 발톱개구리의 치아 발생과정에서 *pitx2*는 치배의 형성 이전에 발현되었고, *pitx2*의 발현으로 치아형성띠를 확인할 수 있었다. 아프리카산 발톱개구리의 치배는 치아형성띠로부터 앞쪽으로 돌출되어 형성되었고, *pitx2*는 모자시기의 치배에서는 강한 발현되었고, 종시기로 발달하면서 미약하게 발현되었다. 이상의 결과로 아프리카산 발톱개구리의 치아형성띠에서 발현되는 *pitx2*는 계승치아의 형성에서도 중요한 역할을 할 것이고 향후 치아발생과정에서 발현되는 유전인자들의 비교분석을 위한 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

1. Nanci A : Development of the tooth and its supporting tissues. In "Ten Cate's Oral Histology." 8th eds., St. Louis, Missouri, pp. 70-82, 2012.
2. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML: Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev.* 97: 939-993, 2017. doi: 10.1152/physrev.00030.2016.
3. Lumsden AG: Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J Biol Buccale* 7: 77-103, 1979.
4. Smith MM: Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evol Dev*, 5: 394-413, 2003. doi: 10.1046/j.1525-142x.2003.03047.x.
5. Fraser GJ, Graham A, Smith MM: Conserved deployment of genes during odontogenesis across osteichthyans. *Proc Biol Sci*, 271: 2311-2317, 2004. doi: 10.1098/rspb.2004.2878.
6. Fraser GJ, Berkovitz BK, Graham A, Smith MM: Gene deployment for tooth replacement in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a developmental model for evolution of the osteichthyan dentition. *Evol Dev*, 8: 446-457, 2006. doi: 10.1111/j.1525-142X.2006.00118.x.
7. Fraser GJ, Graham A, Smith MM: Developmental and Evolutionary Origins of the Vertebrate Dentition:

- Molecular Controls for Spatio-temporal Organisation of Tooth Sites in Osteichthyans. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 306: 183-203, 2006. doi: 10.1002/jez.b.21097.
8. Fraser GJ1, Bloomquist RF, Strelman JT: A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biol* 6: 32, 2008. doi: 10.1186/1741-7007-6-32.
 9. Richman JM1, Handrigan GR: Reptilian tooth development. *Genesis* 49: 247-260, 2011. doi: 10.1002/dvg.20721.
 10. Keränen SV, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J: Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol* 209: 495-506, 1999. doi: 10.1007/s004270050282.
 11. Chen Y, Zhang Y, Jiang TX, Barlow AJ, St Amand TR, Hu Y, Heaney S, Francis-West P, Chuong CM, Maas R: Conservation of early odontogenic signaling pathways in Aves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10044-10049, 2000. doi: 10.1073/pnas.160245097.
 12. Khan M1, Seppala M, Zoupa M, Cobourne MT: Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns* 7: 239-243, 2007. doi: 10.1016/j.modgep.2006.10.001.
 13. Smith MM1, Fraser GJ, Mitsiadis TA: Dental lamina as source of odontogenic stem cells: evolutionary origins and developmental control of tooth generation in gnathostomes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B: 260-280, 2009. doi: 10.1002/jez.b.21272.
 14. Liu W, Selever J, Lu MF and Martin JF: Genetic dissection of *Pitx2* in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* 130: 6375-6385, 2003. doi: 10.1242/dev.00849
 15. Vadlamudi U, Espinoza HM, Ganga M, Martin DM, Liu X, Engelhardt JF and Amendt BA: PITX2, β -catenin, and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter. *J Cell Sci* 118: 1129-1137, 2005. doi: 10.1242/jcs.01706
 16. Amen M, Liu X, Vadlamudi U, Elizondo G, Diamond E, Engelhardt JF and Amendt BA: PITX2 and β -catenin interactions regulate *Lef-1* isoform expression. *Mol Cell Biol* 27: 7560-7573, 2007. doi: 10.1128/MCB.00315-07
 17. Juuri E, Jussila M, Seidel K, Holmes S, Wu P, Richman J, Heikinheimo K, Chuong CM, Arnold K, Hochedlinger K, Klein O, Michon F, Thesleff I: Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development* 140: 1424-1432, 2013. doi: 10.1242/dev.089599.
 18. Juuri E, Isaksson S, Jussila M, Heikinheimo K, Thesleff I: Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci* 121: 509-516, 2013. doi: 10.1111/eos.12095.
 19. Jussila M, Crespo Yanez X, Thesleff I: Initiation of teeth from the dental lamina in the ferret. *Differentiation* 87: 32-43, 2014. doi: 10.1016/j.diff.2013.11.004.
 20. Buchtova M, Handrigan GR, Tucker AS, Lozanoff S, Town L, Fu K, Diewert VM, Wicking C, Richman JM: Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on sonic hedgehog signaling. *Dev Biol* 319: 132-145, 2008. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.03.004.
 21. Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K, Reshef R, de Bakker MA, Vanderschoot K, van den Berge I, van Atten M, Burgerhout E, Beck A, Mirtschin PJ, Kochva E, Witte F, Fry BG, Woods AE, Richardson MK: Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* 454: 630-633, 2008. doi: 10.1038/nature07178.
 22. Smith MM, Fraser, GJ, Chaplin N, Hobbs C, Graham A: Reiterative pattern of sonic hedgehog expression in the catshark dentition reveals a phylogenetic template for jawed vertebrates. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 276: 1225-1233, 2009. doi: 10.1098/rspb.2008.1526.
 23. Mucchielli ML, Mitsiadis TA, Raffo S, Brunet JF, Proust JP, Goridis C: Mouse *Otlx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Dev Biol* 189: 275-284, 1997. doi: 10.1006/dbio.1997.8672.
 24. St. Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y: Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the ex-

- pression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol* 217: 323-332, 2000. doi: 10.1006/dbio.1999.9547.
25. Intarak N, Theerapanon T, Ittiwut C, Suphapeetiporn K, Pomtaveetus T, Shotelersuk V: A novel PITX2 mutation in non-syndromic orodental anomalies. *Oral Dis* 24: 611-618, 2018. doi: 10.1111/odi.12804.
26. Nieuwkoop PD, and Faber J : Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1967.

ABSTRACT

Pitx2* expression, an odontogenic band marker in *Xenopus laevis

Byung Seok Ko, Ji Soo Hong, Byung Keon Park, Young-Hoon Lee

*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, and Institute of Oral Biosciences,
Jeonbuk National University*

Amphibians are polyphyodonts, which continually replace teeth during their lifetime. Tooth development starts from the dental lamina and the tooth germ goes through the placode, bud, cap, and bell stages. The dental lamina contains stem cells and has been reported to express molecular markers. However, little is known about the molecular markers in the odontogenic band of amphibians. In this study, *pitx2* expression in the tooth germ was investigated from 26 days post-fertilization (PF, stage 54) to 41 days PF (stage 57) by using whole mount in situ hybridization in *Xenopus laevis*. The first tooth germ was formed anterior to the choanae and the tooth germs developed in the mesiodistal direction. *Pitx2* was expressed in the odontogenic band from stage 54 onwards and was expressed strongly in the tooth germ at stages 55 and 56. From stage 57, *pitx2* was intensely expressed in the round tooth germs and slender odontogenic band but mildly expressed in the triangular tooth germs. These data demonstrate that *pitx2* is a marker for the odontogenic band in *Xenopus laevis* and may play a critical role in the tooth germ induction and formation.

Keywords: *Xenopus laevis*, odontogenic band, *pitx2* expression