

<抄録>7.P.gingivalis菌体のプロテオーム解析のための2D電気泳動について

著者名(日)	鎌口 有秀, 馬場 久衛
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	179
発行年	2002-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008712/

【考察】これらの結果から、GFP-IP₃R3融合タンパクが細胞内膜上に発現していることが示された。このことは、GFP-IP₃R3融合タンパクが機能的なIP₃Rとして働く可

能性を示唆しており、IP₃Rの局在とシグナル応答との関係の解明に役立つと期待される。

7. *P. gingivalis* 菌体のプロテオーム解析のための2D電気泳動について

○鎌口 有秀, 馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

【目的】歯周病の主要原因細菌の1つである*P. gingivalis*のゲノムの全シーケンスの解析はほぼ終了しており、ポストゲノム解析が可能になりつつある。ポストゲノム解析の1つであるプロテオーム解析を行う場合、目的物質を可溶化後、2D電気泳動し、各スポットを質量分析装置で解析するが、質量分析装置がない場合は2D電気泳動後、プロテインシーケンサーを用いて解析する。後者の場合ゲルをCBBにてスポットが検出できる程度のタンパク質量が必要となる。今回はプロテインシーケンサー使用を前提とした*P. gingivalis*の2D電気泳動の為の可溶化条件について検討した。

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277の菌体およびタンパク質の可溶化にCHAPS, 2-ME, DTT, Urea, Thio Urea, Tris等を用いた。また、protease阻害剤としてTLCKを用いた。1次元目のIEFはImmobiline Dry Strip使用してIPGphorを用いて行った。2次元目は

12.5%ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。

【結果および考察】*P. gingivalis*は1%から4%のCHAPSのみでも菌体は完全に溶解した。しかし、これらを試料とした場合、2D電気泳動パターンは良好でなかった。この原因の1つとしてproteaseの影響も考えられたため、CHAPS溶液にTLCKを添加した。TLCKを0.2mM, 0.5mM添加した場合はCHAPSで菌体は容易に溶解したが、2D電気泳動パターンは良好でなかった。ついで、TLCKを50mM添加した場合、菌体はCHAPSで殆ど溶解しなかった。菌体を溶解させるため加熱後、Ureaを添加しソニケーションした。この結果菌体は大部分溶解した。この可溶化物を超遠心後試料とした。2D電気泳動パターンは比較的良好的な結果が得られた。〔会員外共同研究者：中山浩次（長崎大・歯）中野みよ，太田美智男（名大・医）渡辺俊弘，大山徹（東京農大・生化）〕

8. Platelet-Rich Plasmaの基礎的実験について第1報 血小板の濃縮

○川田 丈司, 越智 守生, 広瀬由紀人, 八島 明弘, 加々見寛行, 國安 宏哉, 坂口 邦彦
(北海道医療大学歯学部歯科補綴学第2講座)

【目的】顎骨に欠損が生じている部位に補綴処置を施す場合、自家骨や骨補填材を骨の補填および骨の再生目的で使用している。しかし、自家骨移植は外科的侵襲や疼痛が大きく、また人工材料であるの骨補填材は高価で、生体適合性は自家骨より劣る。一方、自己血から採取するPlatelet-Rich Plasma(以下PRP)は、TGF- β , PDGF, IGFなどの成長因子が含まれているため、近年は骨再生療法の応用に対してもその有効性が報告されている。今回、臨床で用いられている血小板濃縮法をイヌとウサギに応用して、採取したPRP中の血小板濃縮率を検討した。さらに血小板濃縮法の改良を試み、PRPに含まれる血小板の濃縮の向上を検討した。

【方法】体重約3kgの日本白色種ウサギ雄7羽、体重約

10kgビーグル犬雄3頭、体重約70kg男性3名を被験体とした。採血後、遠心分離装置を用いて、1回目の遠心分離を低速(2400回転)で10分、2回目を高速(3600回転)で15分行った。血小板成分の乏しい分画(PPP)である上澄みはシリンジにて吸引除去し、その残りをPRP(多血小板血漿)とし、その中に含まれる血小板数を測定し、全血の血小板数と比較した。ウサギにおいては、さらに、1.採血時間の短縮、2.遠心分離後の血小板を採取するための採取位置の改良、3.血小板採取用の針の加工、について改良を加えた。

【結果と考察】臨床で用いられている、血小板濃縮法を動物に応用した場合、ヒトでは平均濃縮率6.3倍だったのに対して、イヌでは平均濃縮率6.5倍、ウサギでは平均