

リンカーおよび蛍光タンパク質の最適化によるIP₃プローブ“LIBRA”の改良

○設楽彰子, 谷村明彦, 森田貴雄, 根津顕弘, 東城庸介
北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

【目的】 非興奮性細胞のCa²⁺シグナルは, 主にイノシトール三リン酸 (IP₃) によって調節されている。我々は, 細胞内のIP₃動態を調べるために, IP₃受容体のIP₃結合部位の両端に蛍光タンパク質 (CFPとYFP) を結合させた蛍光プローブ“LIBRA”を開発した。今回は, その蛍光変化率を増加させるための改良について報告する。

【方法】 分子生物学的手法を用いて, LIBRA発現ベクターを改良した。リポフェクション法でCOS-7細胞に改良したベクターを導入し, それらの細胞をサポニンで穿孔して, IP₃刺激による蛍光変化を顕微鏡画像解析システム (AQUACOSMOS) にて測定した。

【結果】 蛍光ドナーであるCFPとIP₃結合部位をつなぐ部分 (リンカ

ー1) 及び, 蛍光アクセプターであるVenus (YFPの変異体) とIP₃結合部位をつなぐ部分 (リンカー2) を最適化するための改良を行った。その結果リンカー1を短いαヘリックスにし, さらにリンカー2に13個の直鎖状のアミノ酸を用いたものが最も大きな蛍光比変化率を示した。次に, Venus及びCFPを, それぞれの円順列変異体 (cp-Venus, cp-CFP; 50, 157, 173, 195, 229番目のアミノ酸をそれぞれ新たなN末端とする蛍光タンパク質) に置換した。その結果Venusをcp50Venusあるいはcp229Venusに置換したもののや, CFPとVenusをそれぞれcp157CFPとcp195Venusに置換したもので, 約40%の蛍光比変化率の増加が認められた。

ニコチンが及ぼすβディフェンシンの発現変化の検索

○中村寿実子*, 安彦善裕**, 西村学子*, 倉重圭史*, 竹嶋麻衣子*
山崎真美*, 齋藤正人**, 荒川俊哉***, 田隈泰信***, 賀来 亨*

*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

**北海道医療大学 個体差医療科学センター

***北海道医療大学歯学部口腔生化学講座

【緒言】 βディフェンシン (hBD) は, 主に上皮から産生されている抗細菌性蛋白質で, 細菌の感染を抑制する事が報告されている。またニコチンはタバコを介して口腔粘膜に悪影響を及ぼすことが知られている有害物質であるが, ニコチンがhBD発現に及ぼす影響については明らかにされていない。本研究では, ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞にニコチンを添加し, hBD-1-2-3の発現変化とその時の細胞内のpathwayについて検索した。

【方法】 ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞を10%FBS含有DMEMにて培養し, ニコチンを2.5, 0.5, 10, 25μg/ml添加後, 経時的にRNAを抽出した。RT-PCR法によりcDNAを作製, hBD-1, -2, -3の発現量と分化傾向の変化をTaqMan probeを用いたreal-time PCR法で観察した。細胞内のpathwayを明らかにするために, インヒビターを添加し, 経時的にRNAを抽出, 同様にhBD-

1, -2, -3の発現変化をreal-time PCR法によって検索した。蛋白抽出は上記同様にそれぞれ培養したヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaTを用いて行った。蛋白抽出後ウエスタンブロッティング法, ELISA法にて検索した。

【結果および考察】 ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞にニコチンを添加したところ, RNA, 蛋白はニコチン濃度および時間依存的にhBD-2の発現の上昇し, 分化傾向も認められた。hBD-1はMG132, SB203580のインヒビター添加により, hBD-2はSB203580のインヒビター添加による発現の抑制が確認され, これらのpathwayにはp38, JNK及びNF-κBの関与が考えられた。以上のことから, 口腔粘膜上皮では, 歯周病プロモーターとなるニコチン刺激によりp38/JNK pathwayを介してhBDsが上昇することで, 細菌感染を回避していることが示唆された。

先天性アンチトロンビン欠損症家系の遺伝子解析

○佐藤陽美*, 垂水隆志**, 金澤 香***, 水上和博*,
油井知雄****, 中林 透**, 家子正裕**, 溝口 到*

*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座

**北海道医療大学歯学部内科学講座

***北海道医療大学口腔外科学第一講座

****北海道医療大学補綴学第二講座

【目的】 血栓症予防のため抗血栓薬の内服症例に対する一般歯科の観血的処置では出血傾向への配慮が必要となる。抗血栓薬が投与される疾患としては脳梗塞や心筋梗塞のほかに先天性血栓性疾患が重

要である。今回我々は先天性アンチトロンビン (AT) 欠損症家系の遺伝子診断を行ったので報告する。

【方法】 発端者および家族のATの抗原量および活性はそれぞれラ