

ら限界希釈法によって得られたクローンを肺血管内皮細胞層下への癌細胞潜り込みを指標にした浸潤アッセイで選択した、高浸潤性クローンSAS-H1と低浸潤性クローンSAS-L1を用いた。方法は、タカラの蛍光ラベルdifferential display kitを用いて行った。すなわち、各クローンからTotal RNAを抽出し9種類のローダミンラベルされたdown streamプライマーと24種類のupstreamプライマーを用いて216通りの組み合わせを使用しPCR反応を行った。次に、変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、両者間で異なる発現を示すバンドをゲルから切り出し回収したcDNA断片をPCRで再増幅後、pUC18ベクターにつなぎ込みの検討を行った。ABI Genetic

Analyzer 310シーケンサーを用いてその塩基配列の決定を行った。

【結果と考察】RT-PCRで再現性を確認できた遺伝子として、1つは低浸潤性で強く発現していた390bpのcDNA断片でLIEG-1と名付け、もう一方は高浸潤性で強く発現していた288bpのcDNA断片でHIEG-1と名付けた。各々の塩基配列についてBLASTを用いたホモロジー検索を行ったところ、低浸潤性で強く発現するcDNA断片LIEG-1は1番染色体に存在するRP5-926E3のヒトDNAに100%一致する結果が得られた。一方、高浸潤性で発現が増強したHIEG-1遺伝子については相同性のある既存の遺伝子は得られなかった。

5. 放射線および過酸化水素により誘導されるアポトーシスについて

○細川洋一郎, 田中 力延, 金子 昌幸,
敦賀 英知*, 入江 一元*, 坂倉 康則*,
矢嶋 俊彦*

(北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座・*北海道医療大学歯学部解剖学第一講座)

【目的】放射線誘発アポトーシスにおいても、最終的にはカスパーゼによりエンドヌクレアーゼが活性化され、DNA切断化がおこり細胞死にいたるとするのが定説になってきている。しかし、放射線のfirst targetおよび初期反応の作用機序は不明である。我々はアポトーシス発生原因とされているOHラジカル量をESRで測定したところ、放射線照射の場合と過酸化水素の場合では、その量に違いのあることに気がついた。これは両刺激の作用場所および初期課程が異なる可能性を伺わせる。そこで今回、両刺激によって誘導されるアポトーシスにおいて、発現する蛋白の違いに注目し、検討を行った。

【材料と方法】細胞はHL60細胞(ヒト骨髄性白血病細胞)を使用した。この細胞に放射線4Gy照射または100 μ Mの過酸化水素を暴露させ、その後の細胞死、DNA断片化、蛋白の発現について経時的に観察した。

【結果と考察】p53positive controlであるMolt-4と比較したところ、放射線照射および過酸化水素によって誘導されるアポトーシスでも、HL60はp53の発現がみられなかった。HL60は放射線照射および過酸化水素暴露後、6時間までにDNA断片化を起こした。この極大期に、Western blotでカスパーゼ3およびその基質であるPARPが活性化されるのが観察された。また放射線照射においてはp21が発現し、Bax, cytochrome CおよびFas抗原(CD95)が発現していたのに対し、過酸化水素暴露ではFas抗原はみられたもののp21の発現はみられなかった。以上の結果から、p53欠損株であるHL60でもミトコンドリアを介した系でアポトーシスを起こしている可能性が考えられる一方、放射線照射と過酸化水素暴露では系に違いのある可能性が示唆された。

6. *Porphyromonas gingivalis*のrgp A遺伝子産物のHGP44の共凝集への関与について

○鎌口 有秀, 鈴木真由美, 宮川 博史,
馬場 久衛
(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

【目的】成人性歯周病の主要原因細菌の1つである*Porphyromonas gingivalis*の歯周局所への付着機構の1つ

として既に付着している細菌に結合することによりその目的を達成する可能性が考えられており、この現象は試

験管内では共凝集として観察できる。我々は *P. gingivalis* は *Prevotella intermedia* と共凝集すること、またこれには *P. gingivalis* の *rgp A* 遺伝子産物が関与する可能性を示唆してきた。しかし、これらの共凝集の機構については明確にできていない。今回は *P. gingivalis* の変異株と *rgp A* 遺伝子産物の HGP44 について検討を行った。

【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 とその変異株, KD-P112 (*rgp A::Em, rgpB::Tc*), KDP129 (*kgp::Cm*), KD-P134 (*rgpA::Em, kgp::Cm*), KDP136 (*rgpA::Em, rgpB::Tc, kgp::Cm*), KDP98 (*fim A* mutant) と *P. intermedia* ATCC 25611 との共凝集を比較した。*rgp A* の種々の長さの DNA fragment を pGEX 6P3 に組み込み GST との融合タンパク質として発現し *P. intermedia* の結合性を検討した。

【結果および考察】*P. gingivalis* ATCC 33277 とその変異株による共凝集の結果、*rgp A* の産物が関与し、*kgp* 産物や *fim A* 線毛は殆ど関与しないことがわかった。*rgp A* 産物の C 末端領域の付着因子ドメインは HGP44, HGP15, HGP17, HGP27 より成り、各ドメインの融合タンパク質に対して *P. intermedia* が結合することを観察した。HGP44 は HGP15, 17, 27 とアミノ酸配列の共通部分をもつことがこれらの理由の 1 つとして考えられた。そこで、HGP44 の前半部分と後半部分の断片を GST との融合タンパク質として発現し、*P. intermedia* の結合性をみたが、両断片に対して結合がみられた。以上のことより HGP44 も共凝集に関与する成分の 1 つであることが強く示唆された。

(会員外共同研究者：中山浩次 (長崎大・歯))

7. *Porphyromonas gingivalis* の検出と定量のための新しい primer について

○鎌口 有秀, 鈴木真由美, 安彦 善裕*,
荒川 俊哉**, 宮川 博史, 田隈 泰信**,
賀来 亨*, 馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座・*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】特定の細菌の細菌数を測定するには一般には検体を培養後、同定作業を行う。この間多くの時間を必要とする。しかし、菌種特異性の高い primer を用いることにより PCR にて検出および定量が可能となりつつある。近年 *P. gingivalis* も 16Sr RNA gene に対する primer を用い検出と定量が検討されている。しかし、*P. gingivalis* の他の遺伝子を標的としても定量が可能と考えられるので *P. gingivalis* の特異的な成分の遺伝子に対する primer を用いて検討した。

【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 を培養後、菌数を測定し、その一定量から DNA を抽出し template とした。定量用の primer pair として下記のものを作製した。(1) *rgp A*, *kgp*, *hag A* の共通部分の primer pair (537bp),

(2) *rgp A* の protease 領域内の 3 種の primer pair (418 bp, 327bp, 321bp)。

【結果および考察】(1) の primer pair では複数のバンドがみられた。これは *hag A* において近接する 4 つの共通領域があるためと思われた。(2) のうち 2 つの primer pair では PCR 産物の melting curve は 2 峰性となり副生成物がみられたが、1 つは melting curve も単峰性であり定量に有効な primer pair であることがわかった。また、この primer pair は *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens* 等とは反応はみられない。以上のことより *P. gingivalis* の *rgp A* の protease 領域の一部を増幅する primer pair を用いて定量できることがわかった。