

〔学会記録Ⅱ〕

東日本歯学会第20回学術大会 一般講演抄録

1. Rapid Cycle Real-Time PCRの定量性に関する検討

○鳥谷奈保子, 荒川 俊哉*, 田隈 泰信*, 安彦 善裕**, 溝口 到
(北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座・*北海道医療大学歯学部生化学講座・
**北海道医療大学口腔病理学講座)

【目的】近年, 遺伝子発現の定量, 一塩基多型の検出, あるいは未知の疾患原因遺伝子の同定を目的として, Rapid Cycle Real-Time PCR (polymerase chain reaction)が応用されるようになった。この方法は, 従来のPCR法に比べて, リアルタイムでのPCR産物のモニターが可能であり, 反応時間が短い, 反応後のゲルによる電気泳動の操作が必要ないなどの利点を有している。Rapid Cycle Real-Time PCRでは, 二重鎖のDNAの非特異に取り込まれるSYBR Green I, あるいは両端を色素で標識したExonuclease probe (TaqMan probe)を用いる方法の2つがあり, 一般的には操作が簡便である前者の方法が用いられる。しかし, 最近の研究によると, SYBR Green IによるPCR産物の定量では目的とする遺伝子のコピー数とその定量性に影響を及ぼすことが指摘されている。そこで, 本研究では両者のPCR産物の定量の信頼性に関して比較検討を行った。

【方法】(1)Modular proteoglycanの一種であるパーシカン分子に対するcDNA(GenBank accession #

AF072892)をベクター(pDrive II)にsubcloningし, 連続希釈系(0から 10^8 コピー数)の試料を作製した。(2)Forwardとreverse primer, およびTaqMan probeを作製し, LightCycler(Roche, Germany)にてSYBR Green IとTaqMan probeによるPCRを行った。

【結果】(1)SYBR Green Iでの定量では, 10^3 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な比例関係が認められた。(2)TaqMan probeを用いた方法では, 10^2 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な関係が認められた。(3)Standard curveの回帰分析より, どちらの実験系でもDNA濃度とcycle数に非常に高い相関(SYBR Green I: $r^2 = 0.999$, TaqMan probe: $r^2 = 0.997$)が見られた。

【結論】Rapid Cycle Real-Time PCRを行う場合, 低コピーの試料に対しては, SYBR Green IよりもTaqMan probeを用いたほうがその定量の信頼性が高いことが明らかになった。

2. 骨芽細胞および骨細胞における, シェアストレスに応答するCyclooxygenase-2の転写調節因子の同定とプロスタグランジンE2合成酵素の解析

○荒川 俊哉, 岡山 三紀*, 溝口 到*, 田隈 泰信
(北海道医療大学歯学部口腔生化学講座・*北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座)

【目的】プロスタグランジン(PG)E2は骨形成や吸収に関わる重要な因子の一つである。骨芽細胞や骨細胞にメカニカルストレスの一つであるシェアストレスを負荷するとPG合成の律速酵素であるCyclooxygenase-2(COX

-2)遺伝子の増強が見られる。そこで, COX-2遺伝子のプロモーター領域の遺伝子配列を用いて, シェアストレスに応答する転写調節因子の同定を行った。また, COX-2に続いて誘導されるPGE2合成酵素の発現についても