

〔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

検討を行った。

【方法】骨芽細胞MC3T3-E1および骨細胞MLO-Y4にシェアストレスを負荷し、核蛋白を精製した。マウスCOX-2遺伝子のプロモーター領域に存在する転写調節因子結合配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し、³²Pで標識後、精製した核蛋白を用いてゲルシフトアッセイを行った。また、転写開始点の5'上流の転写調節領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイを行った。PGE2合成酵素についてはそのmRNAの発現量を検討した。

【結果】ゲルシフトアッセイの結果、骨芽細胞MC3T3-E1では、AP-1およびC/EBPβのelementに、骨細胞MLO-Y4においてはCRE elementに結合する蛋白がシェアストレスによって増強された。骨芽細胞MC3T3-E1を用いたルシフェラーゼアッセイにおいては、CRE、AP-1およびC/EBPβに活性が見られた。

【結論】骨芽細胞および骨細胞において、COX-2はシェアストレスの負荷によってAP-1、C/EBPβ、CRE elementを介して転写が増強されていることが示唆された。

3. 小児歯肉におけるβディフェンシン-1,-2,-3 mRNAの発現解析

○島袋鎮太郎, 齋藤 正人, 坂口 也子, 野呂 大輔, 西村 学子*, 賀来 亨*, 五十嵐清治, 安彦 善裕*
(北海道医療大学歯学部小児歯科学講座・*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座)

【目的】βディフェンシンは各種上皮細胞での発現が報告されており、歯肉口腔粘膜上皮でもβディフェンシンの発現が確認されている。ヒトβディフェンシン(hBD)はグラム陽性、陰性菌および真菌などの、う蝕や歯周炎の原因菌に幅広い抗菌作用が報告され、これらの疾患の予防に関与することが示唆されている。

本研究では、小児歯肉におけるhBD-1,-2,-3 mRNAの発現状態を明らかにし、その発現と炎症程度の相関について検索することを目的とした。

【方法】口腔粘膜のhBD mRNAの局在を確認するため、hBD-2のIn situ hybridizationを行った。HBD-2 cDNAからジゴキシゲニン標識アンチセンスRNAプローブを作製し、抗ジゴキシゲニン抗体により検出した。小児歯肉のhBD-1,-2,-3 mRNAと口腔粘膜上皮の炎症

マーカーであるIL-8 mRNAの発現を定量するため、Real Time PCR法装置であるLight Cycler™を用いた。

【結果および考察】小児歯肉において、免疫染色ではhBD-2タンパクが重層扁平上皮角化層直下の顆粒層に局在し、in situ hybridizationではhBD-2 mRNAが顆粒層から棘細胞層の上皮内に広く局在していた。

hBD-1とIL-8 mRNA発現量は強い相関係数が認められた。hBD-2とIL-8 mRNAは極めて強い相関係数を有し、hBD-3とIL-8 mRNAでも極めて強い相関係数を有した。

以上から、小児歯肉の炎症程度とhBD-1,-2,-3 mRNAの発現が相関することが認められ、歯肉炎とβディフェンシンの密接な関係が示唆された。

4. βディフェンシン2プロモータ領域の変異が転写発現活性におよぼす影響

○西村 学子, 安彦 善裕, 草野 薫, 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・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】βディフェンシン(hBD)は主に上皮細胞が産生する抗細菌性のタンパクである。口腔扁平上皮癌由来KB細胞は、hBD発現が他の細胞に比べ減弱し、またhBD-2のダイレクトシークエンシングにより、プロモータおよびエクソン領域数カ所に変異のあることが解った。本研究ではKB細胞におけるプロモータ領域の変異がhBD-2の転写発現活性に及ぼす影響について検討した。

【方法】KB細胞のhBD-2の変異部位の検索は、Total

DNA抽出後PCRによる増幅を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, CA) によるダイレクトシークエンシングによって変異部位を同定した。hBD-2のプロモータ領域の転写活性の確認はLuciferase reporter assayにより変異が確認されたhBD2プロモータ領域を含むものと、それをGeneEditor in vitro Site-Direct Mutagenesis (Invitrogen, CA) により変異を正常に置換した配列を含むluciferase gene constructを作