

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プロモーター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、プロモーター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ー領域の変異が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のプロモーター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プロモーター領域を含むものと、それをGeneEditor in vitro Site-Direct Mutagenesis (in vitro gen, CA) により変異を正常に置換した配列を含むluciferase gene constructを作

製,それぞれKB細胞に導入し,転写活性を比較検討した。さらに変異部位と核タンパク結合親和性をGel shift assayにより検索した。

【結果】変異の確認された転写因子領域C/EBP β , SOX 5, TATA box近傍領域を正常に置換したconstructは,変異をもつconstructと比較すると転写活性の促進が認

められ,またTATA box近傍で核タンパクの結合親和性に変化が観察された。

【考察】以上の結果から,KB細胞におけるhBDの発現低下はプロモータ領域の変異による転写発現活性の減少によることが示唆された。

5. トロンビン刺激により惹起されるヒト歯肉線維芽細胞のカルシウムシグナル

○田中 信久, 森田 貴雄*, 根津 顕弘*, 谷村 明彦*, 溝口 到, 東城 庸介*
(北海道医療大歯学部歯科矯正学講座・*北海道医療大歯学部歯科薬理学講座)

【目的】プロテアーゼ受容体PAR (protease-activated receptor)はトロンビン(TB)やトリプシンなどのセリンプロテアーゼで活性化される7回膜貫通型受容体である。現在までに,4種類のサブタイプがクローニングされ,多様な生理的機能を有していることが明らかにされてきた。本研究では,培養ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)に存在するPARを同定し,PARを介するカルシウムシグナル応答を解析した。

【方法】細胞内にfura-2を取り込ませ,細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の変化をCa²⁺画像解析システム(ARGUS-HiSCA)を用いてモニターした。mRNAの発現はRT-PCR法を使って調べた。

【結果】 α -トロンビン(α -TB)は濃度依存的に一過性

の[Ca²⁺]_i上昇を起こした。10nMで最大反応を示し,EC50値は0.8nMであった。 α -TBより活性の弱い β -TB, γ -TBのEC50値はそれぞれ5nMと60nMであった。PARタイプ1の合成アゴニストペプチドは, α -TBと同様の[Ca²⁺]_i上昇を起こしたが,タイプ2及びタイプ4の合成アゴニストペプチドは全く効果がなかった。RT-PCR法によりmRNAを調べたところ,タイプ1-mRNAの強い発現が認められた。タイプ2及びタイプ4のmRNA発現は検出されなかった。タイプ3のmRNA発現は極めて弱かった。

【結論】トロンビンはHGFのPARを活性化し,Ca²⁺動員を起こした。RT-PCR解析によりHGFに存在するPARは主にタイプ1であることが明らかとなった。

6. GFPを用いたイノシトール1,4,5-三リン酸受容体の細胞内局在の可視化

○森田 貴雄, 谷村 明彦, 根津 顕弘, 東城 庸介
(北海道医療大歯学部歯科薬理学講座)

【目的】イノシトール1,4,5-三リン酸受容体(IP₃R)は細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出の重要な担い手であり,その細胞内分布は主に免疫組織化学法を用いて解析されてきた。本研究は,クラゲの発光タンパクであるGreen Fluorescent Protein (GFP)とラットIP₃Rとの融合タンパクを作製し,これを生きた細胞に発現させて,その細胞内局在を可視化することを試みた。

【方法・結果】GFP cDNAをラット type3 IP₃R (IP₃R3) cDNAのN末側に結合し,GFP-IP₃R3融合タンパクを発現させるプラスミドベクターを作製した。このベクターをヒト唾液腺培養細胞(HSY)およびヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)に導入し,融合タンパクを発現させた。ウェスタンブロット解析により,この融合タンパクは完

全長のGFPおよびIP₃R3タンパクを含んでいることがわかった。次に,共焦点レーザー顕微鏡でGFP蛍光を観察することによりその細胞内局在を調べた。この融合タンパクは,核を除く細胞質内に,網目状にほぼ均一な強さで発現していた。さらに,小胞体マーカーであるDiOC₆の蛍光パターンと比べたところ,これらの分布はよく似ていた。また,この融合タンパクが細胞内膜構造に発現することを確かめるために,サポニンで細胞膜に穴をあけ,細胞質の可溶性成分を除去した。その結果,網目状の蛍光はほとんど消えずに残っていた。対照的にGFPのみを発現させた細胞では,核を含む細胞全体にGFPの蛍光が観察され,サポニン処理によりその蛍光はほとんど消失した。