

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 $\beta$ , 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Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の変化をCa<sup>2+</sup>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】 $\alpha$ -トロンビン( $\alpha$ -TB)は濃度依存的に一過性

の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>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。 $\alpha$ -TBより活性の弱い $\beta$ -TB,  $\gamma$ -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,  $\alpha$ -TBと同様の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>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, Ca<sup>2+</sup>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(IP<sub>3</sub>R)は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>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IP<sub>3</sub>R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 IP<sub>3</sub>R (IP<sub>3</sub>R3) cDNAのN末側に結合し, GFP-IP<sub>3</sub>R3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IP<sub>3</sub>R3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DiOC<sub>6</sub>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。

【考察】これらの結果から、GFP-IP<sub>3</sub>R3融合タンパクが細胞内膜上に発現していることが示された。このことは、GFP-IP<sub>3</sub>R3融合タンパクが機能的なIP<sub>3</sub>Rとして働く可

能性を示唆しており、IP<sub>3</sub>Rの局在とシグナル応答との関係の解明に役立つと期待される。

## 7. *P. gingivalis* 菌体のプロテオーム解析のための2D電気泳動について

○鎌口 有秀, 馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

【目的】歯周病の主要原因細菌の1つである*P. gingivalis*のゲノムの全シーケンスの解析はほぼ終了しており、ポストゲノム解析が可能になりつつある。ポストゲノム解析の1つであるプロテオーム解析を行う場合、目的物質を可溶化後、2D電気泳動し、各スポットを質量分析装置で解析するが、質量分析装置がない場合は2D電気泳動後、プロテインシーケンサーを用いて解析する。後者の場合ゲルをCBBにてスポットが検出できる程度のタンパク質量が必要となる。今回はプロテインシーケンサー使用を前提とした*P. gingivalis*の2D電気泳動の為の可溶化条件について検討した。

【方法】*P. gingivalis* ATCC33277の菌体およびタンパク質の可溶化にCHAPS, 2-ME, DTT, Urea, Thio Urea, Tris等を用いた。また、protease阻害剤としてTLCKを用いた。1次元目のIEFはImmobiline Dry Strip使用してIPGphorを用いて行った。2次元目は

12.5%ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。

【結果および考察】*P. gingivalis*は1%から4%のCHAPSのみでも菌体は完全に溶解した。しかし、これらを試料とした場合、2D電気泳動パターンは良好でなかった。この原因の1つとしてproteaseの影響も考えられたため、CHAPS溶液にTLCKを添加した。TLCKを0.2mM, 0.5mM添加した場合はCHAPSで菌体は容易に溶解したが、2D電気泳動パターンは良好でなかった。ついで、TLCKを50mM添加した場合、菌体はCHAPSで殆ど溶解しなかった。菌体を溶解させるため加熱後、Ureaを添加しソニケーションした。この結果菌体は大部分溶解した。この可溶化物を超遠心後試料とした。2D電気泳動パターンは比較的良好的な結果が得られた。〔会員外共同研究者：中山浩次（長崎大・歯）中野みよ、太田美智男（名大・医）渡辺俊弘、大山徹（東京農大・生化）〕

## 8. Platelet-Rich Plasmaの基礎的実験について第1報 血小板の濃縮

○川田 丈司, 越智 守生, 広瀬由紀人, 八島 明弘, 加々見寛行, 國安 宏哉, 坂口 邦彦  
(北海道医療大学歯学部歯科補綴学第2講座)

【目的】顎骨に欠損が生じている部位に補綴処置を施す場合、自家骨や骨補填材を骨の補填および骨の再生目的で使用している。しかし、自家骨移植は外科的侵襲や疼痛が大きく、また人工材料であるの骨補填材は高価で、生体適合性は自家骨より劣る。一方、自己血から採取するPlatelet-Rich Plasma(以下PRP)は、TGF- $\beta$ , PDGF, IGFなどの成長因子が含まれているため、近年は骨再生療法の応用に対してもその有効性が報告されている。今回、臨床で用いられている血小板濃縮法をイヌとウサギに応用して、採取したPRP中の血小板濃縮率を検討した。さらに血小板濃縮法の改良を試み、PRPに含まれる血小板の濃縮の向上を検討した。

【方法】体重約3kgの日本白色種ウサギ雄7羽、体重約

10kgビーグル犬雄3頭、体重約70kg男性3名を被験体とした。採血後、遠心分離装置を用いて、1回目の遠心分離を低速(2400回転)で10分、2回目を高速(3600回転)で15分行った。血小板成分の乏しい分画(PPP)である上澄みはシリンジにて吸引除去し、その残りをPRP(多血小板血漿)とし、その中に含まれる血小板数を測定し、全血の血小板数と比較した。ウサギにおいては、さらに、1.採血時間の短縮、2.遠心分離後の血小板を採取するための採取位置の改良、3.血小板採取用の針の加工、について改良を加えた。

【結果と考察】臨床で用いられている、血小板濃縮法を動物に応用した場合、ヒトでは平均濃縮率6.3倍だったのに対して、イヌでは平均濃縮率6.5倍、ウサギでは平均