

6. 唾液腺由来細胞HSYの構成的分泌におけるVAMPの役割

○大石 洋平^{*,**}, 荒川 俊哉^{**}, 溝口 到^{*}, 田隈 泰信^{**}
 (*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】 VAMP-2は多くの分泌細胞の分泌顆粒膜にv-SNAREとして存在し、細胞膜に存在するt-SNAREと複合体を形成することにより、両膜のドッキング・融合を促進する。VAMP-2は破傷風毒素により切断され失活するが、最近、毒素非感受性のVAMP (TI-VAMP/VAMP-7)が報告され、開口分泌とエンドサイトーシスにおける役割が注目されている。本研究では、HSY細胞とPC12細胞の構成的および調節的分泌におけるVAMPの役割を解析した。またGFP標識ヒト成長ホルモン (hGH)を用い、分泌過程の可視化と定量を試みた。

【方法】 ラット耳下腺から、各VAMPのcDNAをPCRクローニングし、C端をGFP標識するプラスミドを構築した。分泌実験では、HSY細胞、PC12細胞にhGHを発現

させ、1 μ Mイオノマイシン刺激による分泌量をELISA法で測定した。各VAMP-GFPとhGHを共発現し、それらの局在部位と動態を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果】 hGHは、HSY細胞では構成的に分泌され、PC12細胞では調節的に分泌された。共焦点レーザー顕微鏡を用いた連続撮影では、GFP標識したhGHは細胞内を高速で移動する像が観察された。PC12細胞では、hGHを含む分泌顆粒はVAMP 2-GFPと一致して存在したが、HSY細胞ではVAMP 7-GFPと一致して存在し、VAMP 2-GFPとは一致しなかった。

【結論】 TI-VAMP/VAMP-7は、構成的分泌のv-SNAREとして機能している可能性が示唆された。

7. 歯髄中のBone morphogenetic protein (BMP) mRNAの定性および定量

—マウス骨芽細胞MC 3 T 3 -E 1 とのBMP発現量の比較検討—

○伊藤 勝敏^{*,**}, 村田 勝^{*}, 荒川 俊哉^{**}, 田隈 泰信^{**}, 有末 眞^{*}
 (*北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】 Bone morphogenetic protein (BMP)は強力な骨誘導因子である。我々はリコンビナントヒトBMP-2とコラーゲンなどの担体基質を利用して骨誘導研究を行うとともに抜去歯象牙質の骨・軟骨誘導を組織学的に証明した。また歯髄には幹細胞とBMPが存在することが報告されており、硬組織再生のための細胞・成長因子の供給源として再利用可能であると考えられる。そこで、歯髄中のBMPが骨再生に利用できる濃度を維持しているかを検討するためにBMP mRNAの定性および定量を行った。さらに、発現量の有効性を検討するためにマウス骨芽細胞MC 3 T 3 -E 1でのBMP発現量との比較を行った。

【方法】 インフォームドコンセントによって同意を得た抜去歯歯髄細胞およびマウス骨芽細胞MC 3 T 3 -E 1より、Tryzol reagentを用いてtotal RNAを抽出し、Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)によりBMP-2, 4, 6, 7の発現を検討した。BMP mRNAの定量は、ATTO Light-Captuerによって半定量を、またRoche LightCyclerおよび

ABI Prismを用いたSyberGreenによって定量を行った。

【結果および考察】 RT-PCRによりBMPの発現を検討した結果、MC 3 T 3 -E 1細胞にはBMP-2, 4, 7が、歯髄中にはBMP-2, 4, 6, 7の全てが発現していることが明らかになった。ATTO Light-CaptuerによるPCR産物の半定量によって、歯髄ではBMP-4および7がBMP-2および6よりも多く発現していることが明らかになり、またMC 3 T 3 -E 1細胞のBMPの発現量と比較した結果、同等もしくはそれ以上の発現が認められた。したがって、歯髄中には骨誘導可能なBMP量の存在が示唆された。