

4 先進診断技術の開発と応用研究班

4-1 歯科疾患の遺伝子診断の開発と応用研究グループ

4-1-32 カスタムメイド DNA チップを応用した歯科診断

<研究概要>

ゲノムプロジェクトの進歩に伴い、大量の遺伝子情報を一度に処理、解析する必要性が高まってきた。このようなニーズに答える1つの手法として DNA マイクロアレイが開発され現在に至っている。Genbank および TIGR database から主な病原性遺伝子をそれぞれ選択し、PCR 法によって特異的領域を増幅した後、DNA スポッターにてカスタムメイドマイクロアレイを作成した。またマイクロアレイ実験の条件を検討後、その実験条件の妥当性を RT-PCR にて確認した。*P. gingivalis* においては外部環境に対応する本菌体の病原性遺伝子の発現解析を行うため、①細菌の各増殖期における RNA 抽出、②ヘミン制限下からの RNA 抽出、③酸化ストレス後の RNA 抽出を行い、本マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。*S. mutans* に関しては pH 変化後の RNA 抽出を行い、本マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、*P. gingivalis* のマイクロアレイ解析において①細菌の各増殖期における遺伝子発現解析では、EL 期で増加している遺伝子の多くが酸化ストレス応答性であった。ML 期に対して LL 期では全体的に発現比が高まる傾向にあるものの、その大部分が2倍以内であった。また、ST 期ではおよそ50%の遺伝子の発現量が大きく減少していた。②ヘミン制限下における遺伝子発現解析では、コントロール郡に比べてヘミン制限下郡で発現量が高くなったのは HGP15, Rgp1, DPS, GroEL, Kgp などであり、また逆に低くなったのは Ferritin, SOD, Ef-g, HmuR, FtsA などであった。③酸化ストレスにおける遺伝子発現解析では、酸化ストレス応答性遺伝子群はストレス直後に遺伝子発現レベルが上昇した。他の病原性遺伝子群の発現レベルは上昇することなく、時間と共に減少した。また *S. mutans* のマイクロアレイ解析においては *ahpC* 等が酸性環境下で遺伝子発現が低下し、*dnaK*, *dnaJ*, *lacA*, *lacD*, *lacG*, *lacF*, 等のストレスタンパク質やラクトース代謝系が大きな変動を見せた。これらの結果から、これら菌体は各環境に応じて生存・増殖・代謝・するために必要なタンパク質の発現量を遺伝子発現レベルで機敏に調節しているものと考えられた。

<得られた知見>

口腔内生息する菌体の歯周ポケットや歯垢内など変化の著しい外部環境に対応する病原性遺伝子の発現変化があきらかとなったことで将来、患者個人の有する本菌体の悪性度を診断する指標ができた。また、これらの診断を実際に臨床サンプルで行うためには極微量の RNA を増幅する必要が生じる。臨床分離試料を培養・増殖してしまうと、本来の遺伝子の mRNA 発現が大きく変動することが予想されるため、生体内に生息する細菌のありのままの病原性を掌握するには、培養等の過程を経ないで、いかに効率良く RNA を採取し、リニア増幅させるかが菌体病原性のトランスクリプトーム解析の臨床応用を睨んだ場合に重要な鍵となる。そこで我々は原核生物 RNA 増幅用のプライマーを考案した。このプライマーは現存するあらゆる種類の真核生物用 RNA 増幅キットに適応可能であり、実際にナノグラムオーダーの RNA を増幅する事でマイクロアレイ解析をするのに十分な量に増幅可能であった。