Intrastriatal microstimulation induces EMG activity in the jaw-opener and tongue-protruder in rats

Niichiro Amano, Yoshiko Takatsuki, Kenichi Yoshino, Shigenori Kawagishi and Yoshimasa Yanase
(Department of Oral Neuroscience, Kyushu Dental College)

It has presently be found that intrastriatal microstimulation induces EMG activity not only in the ipsilateral jaw-opener (anterior digastric muscle), but also in the bilateral tongue-protruder (genioglossus muscle) in lightly anesthetized rats. No activity was recorded in the tongue-retractor (hyoglossus muscle) and the head muscles innervated by the facial (VII) nerve, as well as in the jaw-closers (masseter and temporalis muscles). The effective sites were histologically confirmed to be localized in a small central region of the dorsal striatum at a caudal level of the anterior commissure. These sites were identical to those reported last year to induce a considerable EMG activity in the jaw-opener.

20. Site-directed mutagenesis による *Prevotella intermedia* 酸性ホスファターゼの活性ドメインの解析について

○陳 霄遲・安細 敏弘・栗野 秀慈・竹原 直道

九歯大・予歯

我々は、最近チロシンホスファターゼ活性を有する歯周病関連菌 *Prevotella intermedia* の酸性ホスファターゼ (PiACP) が、腸内細菌 class A ACP ファミリーおよび哺乳類の glucose-6-phosphatase (G6Pase) などに共通なモチーフを有することを明らかにした。今回はモチーフ中に存在するヒスチジン残基とアルギニン残基の活性における役割を検討した。“Megaprimer”法により、点変異株および欠失変異株を作製し、また、タンパク質の発現誘導を行い、phosphocellulose カラムを用いて精製を行った。基質として pNPP, 合成ペプチド EGFR, PDGFR を用いて精製変異 PiACP の活性を測定した。

H170Q, H209T, R140K, R142E およびモチーフ GSYPGHT 欠失変異株を得た。H170Q, H209T およびモチーフ欠失の精製変異 PiACP は pNPP, EGFR および PDGFR の各基質に対して活性を示さなかった。本結果は H170 および H209 が活性発現に不可欠であることを示すとともに G6Pase の活性触媒機構と類似している可能性を示唆している。

Site-directed mutagenesis and mechanism of *Prevotella intermedia* acid phosphatase

Xiaochi Chen, Toshihiro Ansai, Shuji Awano and Tadamichi Takehara (Department of Preventive Dentistry, Kyushu Dental College)

We have examined the catalytic importance of 2 histidine and 3 arginine residues on PiACP, acid phosphatase from *Prevotella intermedia*, which are conserved in class A bacterial acid phosphatases and mammalian phosphatases such as glucose-6-phosphatase (G6Pase). The mutants of H170Q, H209T, R140K, R142E, R203S, Δ N88, Δ N47, and the motif GSYPGHT deletion, were constructed by using site-directed mutagenesis. The purified mutants protein of H170Q, H209T, R142E, R203S, Δ N88, and the motif GSYPGHT deletion have no enzymatic activity against pNPP. These results suggest that the amino acid residues, H170, H209, R142, and R203 are essential for the PiACP catalytic function.

21. 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の phosphofructokinase 遺伝子の同定について

○有本 隆文・安細 敏弘・陳 霄遲・竹原 直道

九歯大・予歯

我々は以前、*Porphyromonas gingivalis* (P.g) の endopeptidase 遺伝子 (P.g pep O) をクローニングし、その性質を報告した。今回、我々は P.g pep O 上流域を検索した結果、解糖系の key enzyme である phosphofructokinase (PFK) に相同性の高い領域を認めた。

P.g pep O を含むプラスミド pAL2 の一部をプローブとして EcoRV で完全消化した P.g 381 株の染色体 DNA から約 6.8 kb の DNA 挿入断片を含む陽性クローン pTA21 を得た。挿入断片の全塩基配列を決定した結果、P.g pep

O の上流に 4 つの open reading frame (ORF1, ORF2, ORF3, ORF4) が認められ, ORF2 はホモロジー検索の結果, *Borrelia burgdorferi* や *Treponema pallidum* の PPi-dependent PFK と高い相同性 (約 50 %) を示した. さらに PPi-dependent PFK に認められる fructose-6-phosphate や ATP の binding site も保存されていた. *P.g* は糖分解能をもたない細菌として知られているが, *P.g* PFK がどのような役割をしているのか興味深い.

Identification of a phosphofructokinase gene from *Porphyromonas gingivalis*

Takafumi Arimoto, Toshihiro Ansai, Xiaochi Chen and Tadamichi Takehara (Department of Preventive Dentistry, Kyushu Dental College)

We have determined the nucleotide sequence of the upstream region of endopeptidase (PgPepO) gene encoding a protein homologous to endothelin-converting enzyme. DNA sequence analysis of a 7.0 kb DNA fragment revealed four complete ORFs. The ORF2 encoded a protein (PgPFK) of 550 amino acids with a calculated molecular weight of 61,044 Da. The deduced amino acid sequence exhibited a significant homology (~50 %) with the phosphofructokinase (PFK) protein of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*, and contained the motif conserved among PPi-dependent PFK. Recombinant PgPFK exhibited substantial activity against PPi, but not ATP. These results indicate that PgPFK belongs to PPi-dependent PFK group.

22. ウサギの口蓋扁桃免疫による金属アレルギー誘導の検討

○井上 博雅・福泉 隆喜・辻澤 利行・内山 長司

九歯大・微生物

口腔内の金属アレルギーの感作の経路は不明である. 近年, 口蓋扁桃は抗原を取り込み粘膜免疫を誘導することが示され, 扁桃で金属が感作されアレルギーとなる可能性が生じた. そこでニッケルを扁桃投与しアレルギーが生じるか検討した. 扁桃滴下によって, ウサギに週に 1 回, 6 週間免疫した. 抗原としてニッケル溶液のみを投与したり, 免疫を亢進するために牛アルブミン (BSA) やコレラ毒素 B 鎖 (CTB) を混ぜて投与した. 6 週間後, パッチ法でニッケルとの反応を調べた.

扁桃免疫後, 血清中に BSA に対する抗体が誘導されている場合においても, パッチ法でウサギにアレルギー反応による炎症は生じなかった. この結果は, 口蓋扁桃では細胞性免疫が誘導できない可能性を示唆している. また, BSA を単独で 6 週間投与しても血清抗体を誘導できなかったが, ニッケルを混ぜて投与すると抗体を誘導することがわかった. したがって, ニッケルは口蓋扁桃の免疫系に何らかの作用して, 抗体産生を誘導させる作用があることがわかった.

Study on metal ion induced allergy by tonsillar application of antigen

Hiromasa Inoue, Takaki Fukuizumi, Toshiyuki Tsujisawa and Choji Uchiyama (Department of Oral Microbiology, Kyushu Dental College)

To evaluate the hypersensitive reaction to nickel ion, nickel chloride solution is applied to palatine tonsil of rabbits every week for 6 weeks. The application of the nickel solution with BSA induced serum antibodies to BSA, while the application of BSA alone did not induce the anti-BSA antibody. In these rabbits as well as the rabbits applied the nickel solution alone, no hypersensitive reactions were occurred. Intramuscular injection of BSA greatly induced anti-BSA antibody in serum, while the injection of BSA with the nickel solution induced less concentration of anti-BSA antibody in serum than that induced by the injection of BSA alone. In the rabbits immunized by the injection of the nickel solution with or without BSA, we failed to cause hypersensitive reaction to nickel, however, the hypersensitive reaction to BSA was observed in the rabbits immunized by the injection of BSA with or without nickel. Although we failed to cause hypersensitive reaction to nickel, we found that nickel ion appears to modulate some immunological reactions and affect the antibody production in lymphoid tissue.