

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 303 号	学位申請者	山根 隆史
審査委員	主査	西 順一郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 橋口 照人
	副査	有馬 直道	副査 武田 泰生

主査および副査の5名は、平成26年8月27日、学位申請者 山根 隆史君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) cDNA microarray に関して、gyrase と topoisomerase の変異は確認したか。

(回答) 同部位の塩基配列は確認していないが、重要な指摘と思われるので今後検討したい。

質問2) キノロン耐性株の患者背景はどうだったか。

(回答) 複雑性尿路感染症の患者が多かった。使用された抗菌薬はキノロン系以外のものもみられた。

質問3) cDNA マイクロアレイに使用した5株を選んだ基準は何か。

(回答) キノロン系薬に対する MIC が高く、他の系統の抗菌薬には耐性を示していない株を使用した。

質問4) MIC の違いにより *pspC* や *dam* などの遺伝子の発現差はあるか。

(回答) これらの遺伝子発現は耐性株と感性株では有意差があるが、MIC との関連は検討していない。重要な指摘と思われるので今後検討したい。

質問5) 細菌では高発現している遺伝子を knockout できるか。またそれにより耐性が変わるか。

(回答) 今回はそのような実験を行っていないが、報告ではトランスポーター関連遺伝子の knockout で薬剤感受性が変化したとの報告がある。

質問6) 遺伝子の発現が亢進している原因は何か。コピー数多型か、キノロンへのストレスによる遺伝子の duplication か、またはプロモーター領域に何らかの変化があるのか。

(回答) 細菌では遺伝子の duplication が起こりやすい可能性が報告されているが、個々の遺伝子については今後の検討が必要である。

質問7) Figure 2 で *pspC* は感性株と耐性株で発現に差があるように見える。一方、*dam* では有意差はあるが、発現量を比較すると感性株と耐性株で発現量に差がない検体も多くみられる。*dam* を選択した理由は何か。また、*dam* のキノロン耐性に関するメカニズムはどうなっているのか。

(回答) *dam* と抗菌薬耐性に関する論文報告はない。その機能は遺伝子複製、ミスマッチ修復や転写を誘導するファクターのメチル化機構に関わっているとされており、抗菌薬曝露後の遺伝子障害の修復に関与していると考えこれを選択した。最近の大腸菌の抗菌薬耐性に関する論文では、2つ以上の薬剤耐性機序が関わっていると報告もあり、*dam* は他の薬剤耐性に関わる遺伝子群に影響を与えている可能性がある。

質問8) Table 5 のトランスフォーマントのタンパクの発現量の確認はしたか。

(回答) 適切な抗体がないためにトランスフォーマントでのタンパク量の発現は確認できないため、real time PCR 法を用いて mRNA 発現を確認した。

質問9) *pspC* の発現亢進とキノロン耐性のメカニズムとの関わりは何か。

(回答) *pspC* を含む *psp* 群の遺伝子は細胞内膜に存在する遺伝子で、細胞膜や細胞壁レベルでの抗菌薬の排出促進や取り込み低下に関わっていると考えられる。

質問 10) 膜の障害などを感知するとどのようなシグナルが活性化するのか。

(回答) 細菌には環境感知センサー (ヒスチジンキナーゼ) と細胞内制御因子 (レスポンスレギュレーター) から構成される二成分情報伝達系が存在し、これが環境因子に対するセンシングと情報伝達を担っている。これらが薬物排出システムの発現を誘導し、耐性化を引き起こすと報告されている。

質問 11) Table 5 において、誘導される MIC の上昇のデータは検体によってばらつくのか。

(回答) 検体によるばらつきはなく結果は安定していた。

質問 12) 多剤薬剤排出システムはキノロン系のどの部分を感知するのか。

(回答) 薬剤排出システムはキノロン系薬に特異的ではなく、異物と認識したもの全てを排出しようとする。

質問 13) 大腸菌の標準株と臨床株の違いの本質は何か。

(回答) 標準株は安定していて変異が起りにくく、臨床株は周囲の環境において変化しやすい。

質問 14) 今回使用した株は単純性尿路感染症株か、複雑性尿路感染症株か。

(回答) 両群とも複雑性の株が 8 割以上で両群間に差はない。

質問 15) Table 3 で 2.5 倍以上を選んだ根拠は何か。

(回答) 候補遺伝子の数を絞り込むために任意で設定した。

質問 16) 論文内の discussion で他の抗菌薬との交叉耐性の可能性があると述べているが、選択した株は交叉耐性がない株を選んでいるとの記述と矛盾しないか。

(回答) cDNA マイクロアレイで用いた 9 株のみ交叉耐性の無いキノロン耐性株を用いているが、他の臨床株は交叉耐性を含む株を使用しているため、その指摘は当たらない。

質問 17) 今後臨床応用にこの研究をどのように役立てるか。

(回答) この手法を用いることにより新規の抗菌薬耐性遺伝子を発見することや、*dam* の機能を障害する新規抗菌薬を開発できる可能性がある。

質問 18) Table 5 のトランスフォーマントの実験は 1 株のみで行ったのか。

(回答) 4 株を使用して MIC を測定した。

質問 19) 50 株のうちの 4 株はどのように選んだか。

(回答) 10 株にトランスフェクションを行い、その中で発現を PCR で確認し、高度に発現が亢進していた上位 4 株を用いた。

質問 20) アンピシリン等でセレクションをかけるとプラスミドベクターが組み込まれ、標的遺伝子が必ず発現するのではないか。

(回答) プラスミドベクターのアンピシリン耐性遺伝子のみが導入され、標的遺伝子は導入されていないことが考えられる。

質問 21) 例えば放射性元素などを用いてキノロンをラベルしてバクテリア内のキノロンの濃度を測定できるのか。

(回答) 真核細胞では可能であるが、大腸菌で可能かどうかは今後検討が必要である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。