

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 501 号		学位申請者	有井 かおる
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (歯学)
	副査	仙波 伊知郎	副査	中村 典史
	副査	佐藤 友昭	副査	中村 利明
<p>主査および副査の5名は、平成31年1月21日、学位申請者 有井かおる 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。</p> <p>質問1) 耐性株の分離について：7株全部調べて、<i>vraDE</i> の発現が高いものを選んだのか？過剰発現しないタイプもあったか？<i>vraDE</i> を介さない機構の報告はあるか？</p> <p>(回答) 3回の実験で各々7株ずつ耐性株を分離し検証した結果、各回で分離された7株は同一クローンであったため、各1株ずつの詳細な検証を行った。<i>vraDE</i> 過剰発現しない耐性株は、今回の3回の実験からは分離されていないが、今回以外の実験で見出されており、この株については現在検証中である。</p> <p>質問2) 方法で OD(660 nm 吸光度)=0.5 時に 64 µg/ml を加えたのはなぜか？</p> <p>(回答) sensing の濃度を検証した結果、OD=0.5, 32~64 µg/ml の時、最もよく遺伝子発現がみられたために設定した。</p> <p>質問3) Fig.1 : SAN8 や SAN87 におけるナイシン A 添加時に発現が上がる傾向があるよう見えるが、ナイシン A 添加の有無における統計学的検証をしたか？SAN1, 8, 87 で認めた変異以外に変異はないのか？</p> <p>(回答) 指摘群間の t 検定を行った結果、$p=0.14, 0.17$ でいずれも有意差を認めなかった。また、全遺伝子発現解析をマイクロアレイで検証した結果、今回変異を認めた部位とその関連遺伝子のみ発現に変化を認めたため、今回明らかにした領域の遺伝子変異が耐性に影響している可能性が高いと考えている。他の部位への遺伝子変異も生じている可能性はあるため、今後 SNP 解析で全ゲノム配列を明らかにする予定である。</p> <p>質問4) ナイシン A 曝露により内在性変異が起こる機序は何か？また、環境変化に晒された中で、遺伝子変異はある一定の確率で起こっていて、環境に適応できる変異体のみ生存するという事か？</p> <p>(回答) 内在性変異による遺伝子変異の機序については報告がなく、詳細は不明である。指摘の通り、過酷な環境に曝されることで種々の遺伝子変異株が生じ、結果的に耐性を獲得した株のみが生き残ったと考えられる。</p> <p>質問5) <i>VraDE</i> は、細胞内に入ったナイシン A を排出するのか、それとも入らないようにしているのか？</p> <p>(回答) 詳細は解明されていないが、細胞質の中に入ると細胞死するため、細胞膜に浸透したナイシン A をトランスポーターで排出していると考えている。</p> <p>質問6) 今回分離した株では <i>VraDE</i> が細胞膜に多く発現するが、ナイシン A 以外のものも排除するか？</p> <p>(回答) 今回分離したトランスポーター<i>VraDE</i> 過剰発現株は、ナイシン A を含む細胞膜のリピド A を標的とするバシトラシン、ヌカシンに対する耐性を示したため、<i>VraDE</i> はこれらの薬剤の排除にも関与すると考えるが、作用部位が異なる薬剤に対する感受性の変化は認めなかったため、他の薬剤の排除には関与しないと考える。</p> <p>質問7) ナイシン A の生体細胞に対する作用は知られているのか？扁平上皮癌にナイシン A が有効とする報告があるため、濃度などの条件によっては作用するのかもしれないがどう考えるか。</p> <p>(回答) ナイシン A はヒト細胞への為害性はないことが報告されているが、ヒトの CHIC1 タンパクに作用し、癌細胞のアポトーシスを促進する報告があるため、今後検証する必要があると考えられる。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 8) 高度耐性株を分離したナイシン A の濃度(1/2MIC×3 回)は、どのように決定したか?

(回答) 2MIC から 1/8MIC までの様々な濃度で検証し、耐性株を得た濃度に設定した。

質問 9) Fig.3 と Fig.6 の mutation の記載が違うようである。complement 株は mutation のあるところを戻したのか?

(回答) Fig.3 については mutation のある高度耐性株由来の遺伝子を発現させ、complement 株とした。一方、Fig.6 については mutation のある高度耐性株と mutation のない野生株の遺伝子を発現させる 2 通りの complement 株を作製した。

質問 10) Fig.4 について、ナイシン(+)でも *braR* 発現を認めているが違いは何か?

(回答) SAN1 株では *braXRS* のプロモーターに変異があるため、*braRS* 自体の発現が上昇しており、ナイシン A 作用時のみセンサーからのリン酸化リレーが起こりトランスポーター *vraDE* を発現する。また、*braRS* が活性化されているため、その発現誘導が高くなることが示唆された。

質問 11) 以前の Yoshida らの報告で、他の TCS についてもナイシン A に対する耐性に関与があったが、今回はどうか?

(回答) MRSA の TCS である ApsRS もナイシン A を感知し、膜の電荷を調節するが、今回の耐性株で発現の上昇は認められなかった。その他の TCS についても発現上昇は認められなかった。

質問 12) 乳酸菌自身はナイシン A に対する防御が働いているか?

(回答) 既報で ABC トランスポーター NisFEG が immunity 因子であることが報告されており、防御的に働くことが考えられる。

質問 13) 高度耐性化させることで、ATP 消費増加による MRSA 自身への為害性はないか?

(回答) 生育速度への変化は認めていないことから、*VraDE* 過剰発現による ATP 消費増加による為害性はないと考えている。しかし、実験で用いた培地は栄養豊富であることから、今後は栄養制限下での検証が必要である。

質問 14) ATP 量の変化は可視化できるのか?

(回答) 細胞質内の ATP 測定は抽出して測定できるが、生菌のまま可視化する方法は報告がない。

質問 15) BraR はレギュレーターだが、他の遺伝子への影響はあるのか?

(回答) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現網羅解析からは、BraR は他の遺伝子への影響はないと考えている。

質問 16) *Sa* にナイシン A を効かせるためにはどうしたら良いか?

(回答) 必要最低限の量を、短期間で投与することが重要であると考えられる。

質問 17) 実際の口腔内の *Sa* はナイシン A に耐性化しているか?

(回答) 当ラボで口腔から分離した *Sa* 臨床分離株では、複数の耐性株を認めた。しかし、本実験で見出された *vraDE* 過剰発現株は認めなかった。

質問 18) 通常食品添加物として使用される時のナイシン A の濃度はいくらか?

(回答) 厚生労働省の食品添加物の基準より、12.5 µg/ml と示されており、100%純度の精製ナイシン A を使用していると考えられる。*Sa* の最小発育阻止濃度の 1/2 濃度であると推定される。

質問 19) Fig.2 に記載されている *braX* とは?

(回答) 二成分制御系は *braXRS* とオペロンを形成しているが、機能はまだ解明されていない。

質問 20) *braS* の変異について、リン酸化は確認しているのか?

(回答) 細菌のリン酸化同定システムは確立されておらず、抗体を用いた哺乳類のシステムにて検出を試みたが、特定部位のリン酸化を検出できなかった。

質問 21) Fig.3 : SAN8 について、相補株では発現が少ないが、どう考えるか?

(回答) MIC 値やタンパク発現の結果などから、相補株は正当に作製できたと判断している。

質問 22) メチシリン感受性 *Sa* ではなく、MRSA を使用した理由は?

(回答) MRSA は多剤耐性を示す株が多く、薬剤選択時の制限もあるため、新しい抗菌剤を用いた対策が喫緊の課題であると考え、使用した。

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(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。