

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 561 号	学位申請者	渡邊 温子
審査委員	主査 於保 孝彦	学位	博士(医学・歯学・学術)
	副査 佐藤 友昭	副査	中村 典史
	副査 松口 徹也	副査	前田 綾

主査および副査の5名は、令和2年3月23日、学位申請者 渡邊温子君に面接し、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) なぜメチシリン耐性を持っていない *Staphylococcus aureus* (以下 Sa) ではなく、MRSA を使用したのか。

(回答) 臨床上問題となる薬剤耐性菌であるため、今回は MRSA を使用した。

質問 2) ナイシン A はグラム陰性菌には抗菌効果を発揮しないのか。

(回答) グラム陰性菌には外膜が存在し、ナイシン A が細胞膜に作用できないため、ナイシン A はグラム陰性菌に抗菌効果を発揮することができない。

質問 3) ナイシン A が SAN2 株には結合できなくなるのはなぜか。

(回答) ABC トランスポーターである PmtABCD によってナイシン A が細胞膜に結合した時点で排出されるためであると考えられる。

質問 4) ナイシン A の濃度に関して、低濃度と高濃度というのはどのように定義しているのか。

(回答) 明確な定義は無いが、今回は 1/2 MIC (Minimum inhibitory concentration: 以下 MIC) を基準に、1/2 MIC 以上を高濃度、1/2 MIC 以下を低濃度とした。

質問 5) 今回ナイシン A 以外に使用したバシトラシンやガリデルミンなどは抗菌薬として第一選択薬ではないが、なぜ MIC の検証を行ったのか。

(回答) Sa はナイシン A に対する耐性化メカニズムと同様のメカニズムでバシトラシン、ガリデルミン、ヌカシンに対する耐性を獲得することが明らかとなっていたため使用した。

質問 6) SAN2 株においてバシトラシン、ガリデルミン、ヌカシンの MIC が上昇しなかったのはなぜか。

(回答) 標的機構やペプチドの構造が異なるため、PmtABCD が認識できなかったと考えている。

質問 7) マイクロアレイを行った際に、ネガティブレギュレーターである pmtR の発現も上がるのはなぜか。

(回答) pmtR と pmtA の間にはプロモーターはなく、pmtR から pmtD までが 1 つのオペロンを組んでいるからであると考えられる。

質問 8) マイクロアレイを行った際に MW1875-1871 以外に MW2 株と比較して発現が大きくなった領域はないのか。また、発現が小さくなった領域はないのか。

(回答) MW1875-1871 以外に顕著に発現が大きくなったり、小さくなったりした領域はなかった。

質問 9) 低濃度ナイシン A に対する低感受性システムで発現する VraDE は 2 量体なのか。VraDE は 4 量体である PmtABCD のように外毒素の排出には関与しないのか。

(回答) VraDE は 2 量体の ABC トランスポーターであり、ナイシン A やバシトラシンの低感受性に関与しているとの報告はあるが、外毒素の排出に関与しているとの報告はない。

最終試験の結果の要旨

質問 10) なぜ 1 MIC のナイシン A 作用時に *vraD* の発現量が SAN2 株は低下しないが、MW2 株は低下したのか。

(回答) MW2 株は高濃度ナイシン A 作用により一部の細菌が死滅するヘテロ耐性であるため、1 MIC 作用時に低下したと考えられる。これに対し、SAN2 株はホモ耐性であるため発現量の低下は認めなかったと考えられる。

質問 11) SAN2 株において *vraD* の発現がナイシン A 作用時には MW2 株と異なるのに対してバシトラシン作用時には MW2 株と同様の傾向を示したのはなぜか。

(回答) SAN2 株においてナイシン A の MIC は上昇していたがバシトラシンの MIC は上昇しなかったことから、ナイシン A とバシトラシンの構造の違いにより PmtABCD の感知の仕方に差が生じたために、*vraD* の発現量に差がでたのではないかと考えられる。

質問 12) SAN2 株では 1/2 MIC 以上のナイシン A を作用させると *vraD* の発現が上っていたということだが、ナイシン A は細胞膜外で BraR にセンシングをかけるのであれば、PmtABCD が働いていたとしても BraR にセンシングがかかると思われるが、かからないのはなぜか。

(回答) 詳細な解析は行っていないが、SAN2 株においては *pmtABCD* が高発現となることで PmtABCD が細胞膜上に多数発現していると予測され、BraR がナイシン A を感知する割合が低下しているためと考えられる。

質問 13) *pmtR* および *pmtA* の発現が濃度依存的でないといえるのはなぜか。

(回答) SAN2 株においてナイシン A 非作用時でも *pmtR* および *pmtA* の顕著な発現を認め、1/32 MIC から 1 MIC のナイシン A 作用時の *pmtR* および *pmtA* 発現量と同様であったことから、濃度依存的ではないと考えた。

質問 14) *pmtR*, *pmtA* および *vraD* が発現していることとタンパクが機能していることは対応すると考えてよいか。

(回答) 今回は SAN2 株の MW1875-1871 の不活性化株において遺伝子の発現量が低下したことや、ナイシン A の MIC が低下したことから遺伝子の発現とタンパクの機能は対応していると考えている。

質問 15) δ -ヘモリジンと β -ヘモリジンの違いは何か。

(回答) δ -ヘモリジンはホスホリバーゼで耐熱性の低分子タンパクであるのに対し、 β -ヘモリジンはホスホリバーゼ C で、37 °C で血球に吸着し 4 °C で溶血させる点が異なる。

質問 16) 今回使用した RN4220 株はヒト由来か動物由来か。

(回答) ヒト由来の株である。

質問 17) 菌血症モデルマウスでの実験を行った際、採血を行い血中の各菌株の菌数を計測したか。行っていない場合は、どうなっていたと考えられるか。

(回答) 菌数計測は行っていない。MW2 株と比較して SAN2 株は免疫システムに対する耐性が増加していることから血中の菌数も増加していたのではないかと予測される。

質問 18) マウスに 10^8 cell の各菌液を接種していたが他の濃度では実験を行っていないのか。

(回答) 予備実験では 10^6 cell や 10^{10} cell の接種も行ったが、 10^{10} cell を接種した場合ではマウスが早期に死亡し、 10^6 cell では有意な差が認められなかったことから、 10^8 cell の菌液を接種することに決定した。

質問 19) 今回使用した系統とは異なる系統のマウスを使用した場合、致死性への影響の結果は変わるのか。

(回答) SIC: ddy 系統以外のマウスを使用した場合でも同様の結果がでるのではないかと考える。

質問 20) 今回分離されたナイシン A 高度耐性化株が食品の保存料によって分離される可能性はあるのか。

(回答) 現在、食品の保存料によってナイシン A 高度耐性化株が生じたとの報告はないが、食品の保存料として使用されているナイシン A が 1 MIC に近い濃度であるため、食品の保存料が長期間作用することで耐性化株が出現する可能性はあると考えられる。

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（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。