

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	大石 一樹
審査委員	主査 鹿児島 大学 准教授 塩崎 一弘
	副査 鹿児島 大学 教授 小松 正治
	副査 鹿児島 大学 准教授 藤田 清貴
	副査 佐賀 大学 教授 濱 洋一郎
	副査 琉球 大学 教授 金子 哲
審査協力者	印
実施年月日	令和3年7月15日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<p style="text-align: right;">(<input checked="" type="radio"/>) 口答 (<input type="radio"/>) 筆答</p> <p>主査及び副査5名は、令和3年7月15日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(水産学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	大石 一樹
<p>[質問1] シアリダーゼNeu3は、自然の状態ではどこに局在しているのか。</p> <p>[回答1] 脊椎動物に共通して、Neu3は形質膜に局在している。</p> <p>[質問2] Neu3を強制発現させた実験系では、膜局在のシグナル配列などを付加したのか。</p> <p>[回答2] シグナル配列を付加しなくとも、強制発現させたNeu3は形質膜に局在する。</p> <p>[質問3] Neu3a安定発現細胞のTLCにおいて、LacCer量は増加していたが、GM3の量にほとんど差がないように見える。Neu3が発現しているにもかかわらず、GM3が一定量に保たれるのはどのような仕組みがあると考えているのか。</p> <p>[回答3] Neu3を過剰発現させた場合でも、GM3合成酵素などの発現が増加することで一定量を維持していると考えられる。または、GM3よりも長鎖のガングリオシドが分解され、GM3のところで分解が抑制されていることが考えられる。</p> <p>[質問4] 脱シアリル化を制御するため、膜上でNeu3を分解するような仕組みは存在するのか。</p> <p>[回答4] 膜上でNeu3を分解するようなメカニズムは報告がない。一定の期間経過した哺乳類Neu3は、エンドサイトーシスで取り込み、分解されることが報告されている。</p> <p>[質問5] 養殖現場で、養殖魚を絶食させることによりNeu3が発現上昇し、その結果<i>E. tarda</i>に感染しやすくなるのか。</p> <p>[回答5] 一般的に、赤潮や大規模な魚病被害が発生した場合は、短期間の餌止めを行うことがあることから、Neu3の発現が増加している可能性はある。ただし、実際の養殖魚を用いた解析を行っていないので、Neu3の発現が変化しているのかについてはわからない。</p> <p>[質問6] 絶食以外でneu3の発現が増加する条件は他にはあるのか。</p> <p>[回答6] 発生段階において魚類neu3の発現が変化することが報告されている。また、哺乳類Neu3を含めて神経分化の際に発現が増加することがわかっている。</p> <p>[質問7] 絶食により肝臓でneu3の発現が増加しているが、絶食前後の肝臓におけるスフィンゴ糖脂質の組成は解析したのか。</p> <p>[回答7] LacCerが蓄積する傾向は認められたが、有意差な差はなかった。</p>	

〔質問 8〕 *E. tarda* が感染した際、メダカ肝臓での *neu3* の遺伝子発現は増加しているのか。

〔回答 8〕 *neu3* の発現が減少していたことを確認している。

〔質問 9〕 Neu3 のアミノ酸配列上には、膜に局在するための GPI アンカー配列や疎水領域などの特徴はあるのか。また、Neu3 は膜に貫通した状態で存在していると考えていいのか。

〔回答 9〕 Neu3 のアミノ酸配列上には、GPI アンカー関連の配列は存在していないが、疎水領域は存在している。また、Neu3 の局在は膜貫通型ではなく細胞膜表面に存在していることがわかっている。

〔質問 10〕 *E. tarda* 感染の確認を qPCR で行っていたが、感染成立のボーダーラインなどを設定していたのか。また、腹部の膨満などの症状は認められたのか。

〔回答 10〕 ボーダーラインなどは設けていないが、感染区のみ *E. tarda* の 16SrRNA の発現が認められたため、感染が成立したとみなした。また感染魚では、肛門の発赤および脾臓の縮小が確認された。

〔質問 11〕 GalCer や GlcCer は感染の足場にならないのに、LacCer が感染の足場になる理由をどのように考えているのか。

〔回答 11〕 GalCer や GlcCer の糖鎖は、糖が 1 つだけなので、宿主細胞表面に近いので足場になりやすいと考えられるが、LacCer は二糖からなり糖の構造が上に伸びている。糖の数の違いが影響していると考えられる。

〔質問 12〕 LacCer はリパーゼとどのように相互作用するのか。

〔回答 12〕 LacCer は細胞膜に局在を示すので、細胞膜の部分でリパーゼと作用している可能性は低いと考えている。エンドサイトーシスなどで細胞内に取り込まれた際に、LacCer がリパーゼと直接結合して活性化していると考えられる。

〔質問 13〕 糖鎖部分の違いだけでなく、セラミド部分の脂肪酸の違いが生理作用に影響するとの知見はあるのか。

〔回答 13〕 セラミドの脂肪酸の違いによっても細菌の感染が変化するとの報告がある。今回は、糖鎖部分の違いに着目して解析しており、脂肪酸部分の違いについては検討していない。

〔質問 14〕 *E. tarda* が LacCer 全体を認識していると結論しているが、スフィンゴ糖脂質はクラスターを膜上で形成することから、クラスターを形成したスフィンゴ糖脂質を認識しているのではないか。

〔回答 14〕 他の細菌では、LacCer がクラスターを形成した形質膜が感染に影響するとの報告があることから、*E. tarda* も同様に感染に関与している可能性はある。