

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 641 号		学位申請者	勝俣 環
審 査 委 員	主 査	於保 孝彦	学 位	博士 (歯学)
	副 査	佐藤 友昭	副 査	中村 典史
	副 査	松口 徹也	副 査	星加 知宏

主査および副査の5名は、令和4年2月8日、学位申請者 勝俣 環 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) sortase は6つのサブファミリーに分類されるが、*Streptococcus mutans* が保有するのは SortaseA (SrtA) の1種類のみであるのか。

(回答) *S. mutans* が保有するのは SrtA の1種類であることが報告されている。

質問2) *S. mutans* UA159 株では6種類の SrtA 依存性タンパク質が報告されているが、これは LPXTG 配列の有無で同定されているのか。実際に、SrtA によって菌体表層にタンパク質が局在していることは確認されているのか。

(回答) UA159 株では、C 末端に LPXTG 配列をもつタンパク質が6種類確認されており、これらについて SrtA 依存性タンパク質と総称している。今回の実験では、抗体を使用してのタンパク質の局在性の確認は行っていない。

質問3) *S. mutans* の表層タンパク質のペプチドグリカンへの接着様式は、SrtA が唯一なのか。

(回答) タイロ酸やリポタイロ酸への結合、 α -ヘリックス膜結合構造や N 末端ジアシルグリセロールを介した細胞膜への挿入などがあるが、唯一 SrtA はタンパク質を細胞壁に共有結合で強固に固定する接着様式である。

質問4) SrtA 依存性タンパク質はどのように細胞壁に組み込まれるのか。

(回答) 細胞質内で SrtA 依存性タンパク質が合成されると、分泌過程で C 末端のソーティングシグナルによって細胞膜にトラップされる。SrtA はスレオニンとグリシンの間のペプチド結合を切断し、スレオニンのカルボキシ末端と合成中の細胞壁架橋構造部分とを共有結合させることが報告されている。

質問5) SrtA 依存性タンパク質として Cnm が報告されているが、UA159 株以外の株に存在するのか。

(回答) Cnm はコラーゲン結合能を持ち、感染性心内膜炎の病原因子として注目されている。*S. mutans* 血清型 f、k 株から多く検出されるが、今回使用した血清型 c の UA159 株からは検出されていない。

質問6) UA159 株はどのように樹立されたのか。

(回答) アラバマ大学歯学部にて口腔から分離された株であり、その後多くの研究者が使用している。UA159 株は血清型 c であり、全ゲノム解析が終了している。

質問7) 二重欠損株を作製する際、使用した薬剤耐性因子は何か。

(回答) 二重欠損株作製の際、始めにスペクチノマイシン耐性遺伝子を用いた相同性組換えを行い、その後エリスロマイシン耐性遺伝子を用いた相同性組換えを行った。

質問8) 各増殖段階によって遺伝子発現量が変化するのはなぜか。

(回答) 細菌にはクオラムセンシング機構が存在し、周囲の菌の密度を感知して遺伝子発現を制御し、変化する生育環境に対応する。増殖後期に発現量が増加した WapA は *S. mutans* の感染後期に必要となり、反対に減少した SpaP、WapE は感染初期に必要とされることが予想される。

最終試験の結果の要旨

質問 9) SrtA 関連遺伝子の発現量は菌株間で差があるのか。

(回答) 今回作製した遺伝子欠損株については、SrtA 関連遺伝子発現量の検証は行っていない。結果には示していないが、臨床分離株 125 株については SrtA 関連遺伝子発現量の検証を行っており、菌株間で発現量に差を認めた。

質問 10) セルデスクを唾液に浸漬した後、表面に被膜を形成したか検証したのか。

(回答) 唾液成分に対する抗体などを用いた検証は行っていない。しかし、予備実験としてセルデスクを唾液に浸漬した場合と PBS のみに浸漬した場合を比較した際、菌体付着率に変化を認めた。

質問 11) 唾液成分への付着と唾液による凝集は同じ唾液成分への結合の検証であるが、得られた結果の違いはなぜか。

(回答) *S. mutans* の結合に関与する主要な唾液タンパク質として gp340 が報告されている。固相に結合した状態と液相に浮遊している状態とでは高次構造が異なるため、検証結果に違いがあったと考えられる。

質問 12) 共凝集能を比較するとき、自己凝集能の検討は行っているのか。

(回答) 各菌株の自己凝集能の検証は行ったが、図表には結果を反映していない。

質問 13) *Fusobacterium nucleatum* と SpaP 欠損株の共凝集能は、開始 1 時間後は阻害されていたが、実験終了時には親株 UA159 と有意差を示さなかったことは、どのような理由が考えられるか。

(回答) SpaP は *F. nucleatum* への付着因子として働くという報告があり、それゆえ SpaP 欠損株は共凝集能が 1 時間経過時点では低下したと考えられる。しかし、*F. nucleatum* は非常に強い共凝集能を持つため、時間経過とともに SpaP 以外のタンパク質の働きによって共凝集し、最終的に親株と有意差を示さなかったことが考えられる。

質問 14) *Porphyromonas gingivalis* と SpaP、WapE 欠損株の共凝集能が増加したのはなぜか。

(回答) SpaP、WapE の存在により *P. gingivalis* との特異的結合能力があるタンパク質が一部マスキングされており、それらが欠損したことにより機能タンパク質が表層に露出し、結果として共凝集能が増加した可能性が考えられる。

質問 15) バイオフィーム形成能は、SrtA 欠損株は著しく減少したが、SrtA 依存性タンパク質欠損株ではいずれも変化を示さなかった。どのような理由が考えられるか。

(回答) バイオフィーム形成には、多因子が協調的に関与する。また SrtA 欠損株は疎水性が UA159 株に比較して低く、バイオフィーム形成の主因である GTF の局在が阻害された可能性が考えられる。

質問 16) GbpC のデキストラン結合性は一般的にはバイオフィーム形成にどのように関与するのか。

(回答) GbpC は菌体周囲に形成されたグルカンに結合することにより菌の集積に関与し、結果的にバイオフィーム形成を促進することが報告されている。

質問 17) 疎水性が失われると膜の構造に変化はあるのか。また病原性にはどのように影響するのか。

(回答) 今回はペプチドグリカンに結合している表層タンパク質についての解析であり、細胞膜構造には直接影響がないと考えられる。以前、疎水性が低下しても抗菌性ペプチド感受性に変化がないことを確認した。病原性については、細菌の疎水性はペリクルや組織への付着に関与することが報告されている。

質問 18) 今回の結果から、歯科保存学領域としてどのような応用が考えられるか。

(回答) SrtA 依存性タンパク質の遺伝子多型性が判明したことから、株間で病原性が異なることが予想される。アミノ酸配列によるデータを集積して参照することにより、う蝕リスク診断の精度向上に応用できる。また、SpaP は *S. mutans* の歯面付着の主要因子であり、機能領域に相当するペプチドを作製し歯磨剤やコーティング材料、充填材料などへの応用が期待できる。

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。