

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 649 号		学位申請者	中 園 賢 太
審 査 委 員	主 査	西 順一郎	学 位	博士 (歯学)
	副 査	於保 孝彦	副 査	西谷 佳浩
	副 査	松口 徹也	副 査	比地岡 浩志

主査および副査の5名は、令和4年2月16日、学位申請者 中園賢太 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) *S. aureus* MW2 *braRS* 不活化株はバクテリオシンの実験ではよく用いられるものなのか。

(回答) *braRS* はバクテリオシンの耐性をコードしており、不活化株は抗菌活性の評価に適切であると判断した。

質問2) indicator 菌を別の菌種に変えた場合に結果は変わってくるのか。

(回答) バクテリオシンは狭域スペクトラムを有し、感受性菌が絞られるため変わってくる。

質問3) プラスミド脱落の抗菌活性を評価する実験で *braRS* 不活化株を用いていないことには理由があるのか。

(回答) *S. epidermidis* の近縁種であり、Direct 法で活性を認めた *S. hominis* を用いた。

質問4) 染色体上の遺伝子とプラスミド上の遺伝子をどのように区別したか。

(回答) NGS では最終的に環状の遺伝子配列が作成される。配列が短いものをプラスミドと判断した。

質問5) epidermin、nukacin の発現は stable なのか。刺激やある環境下で発現するものなのか。

(回答) stable であることが予測される。

質問6) epidermin、nukacin はどういうメカニズムで抗菌活性を発揮しているか。

(回答) 細胞壁の主成分であるプロテオグリカンの前駆体の Lipid II に結合することで細胞壁合成阻害の効果をもたらす。Lipid II に結合、作用することで細胞壁に孔を開け、細菌を死滅させる。

質問7) 本研究で得られたバクテリオシンが臨床的にどのように応用できると考えられるか。

(回答) 歯磨剤としての応用や、含嗽薬に期待される。

質問8) 本研究の感受性試験の結果は、既報の感受性試験の結果と同様であったか。

(回答) 本研究で感受性を示した株に対して、既報の研究でも感受性を認めていた。しかし、表記の違いがあり、indicator 菌毎の抗菌活性が同様であったかは不明である。

質問9) *S. mutans* に対するバクテリオシンの効果についての報告は頻繁にされているのか。

(回答) *S. mutans* に関するバクテリオシンの報告は存在するが多くはない。

質問10) バクテリオシン産生株は150株中2株だったのか、それとも複数あるバクテリオシン産生株のうち2株を解析したということか。また、今回のバクテリオシン産生株の確率は、過去の報告と比較して確率的には同様であるのか。

(回答) バクテリオシン産生株は150株中3株であったが、2株に対して検証を行った。本研究で行った分離方法が過去の報告に存在しないため、臨床分離株中のバクテリオシン産生株の確率の比較については明らかでない。

質問11) *epiT* はどういう役割を果たしている遺伝子なのか。また、*epiT* 遺伝子が分断しているとはどういう意味なのか。

(回答) *epiT* はバクテリオシンの分泌遺伝子である。遺伝子の分断とは、塩基配列の断端に *epiT* が存在していたことが考えられる。

質問12) 遺伝子が分断されたというのは2つの異なる遺伝子が融合して新しい一つの遺伝子になっているのか、

最終試験の結果の要旨

それとも、1つの遺伝子が分断されて機能しなくなっているのか。

(回答) 1つの遺伝子が2つに分断されており、機能低下していることが予測されるが、epiderminの分泌は認められた。

質問13) プラスミド脱落株をどうやって作ったのか。

(回答) 一晚培養した *S. epidermidis* の菌液にアクリフラビンを添加し、培地上で培養した。

質問14) アクリフラビンの添加のみで全菌でプラスミドが脱落するわけではないはずなので、脱落株が優位に増殖できる環境で回収したということか。

(回答) 複数のコロニーをピックアップし、抗菌活性がない株をプラスミド脱落株と予測した。

質問15) 1つの細菌が複数プラスミド保持しており、バクテリオシンを複数産生している可能性はあるのか。

(回答) 複数のバクテリオシンを産生する他の細菌は存在するが、本研究では検出されなかった。

質問16) 今後は、本研究で分離された口腔由来の *S. epidermidis* と皮膚由来の *S. epidermidis* での比較が重要になってくると考えられるが、現段階でどのような考察をしているか。

(回答) 生体の口腔から分離される菌と皮膚から分離される菌のゲノム配列は基本的に同じである。ごく稀に違うゲノム配列を持つものが存在するケースがあるので、その場合は比較が必要になる。

質問17) *S. epidermidis* が口腔から分離される報告はあるのか。

(回答) ある。口腔由来のバクテリオシン産生性 *S. epidermidis* については初めてである。

質問18) *S. epidermidis* が誘発する口腔疾患については、まだわかっていないのか。

(回答) 齲蝕が少ない小児に *S. epidermidis* が多い割合で検出されるという報告があり、生体の防御に関与することが考えられる。

質問19) *S. epidermidis* の近縁種で口腔から分離される菌はあるのか。

(回答) 近縁種の *Staphylococcus warneri* などが存在する。

質問20) 唾液を綿棒で拭ったとのことだったが、部位はどこを擦過したのか。

(回答) 部位については特定しなかった。口腔粘膜、舌、歯面の全体を擦過した。

質問21) バクテリオシンは菌体から遊離されるのか。

(回答) 分泌型なので遊離される。

質問22) バクテリオシン精製の際に何℃で evaporation を行ったのか。

(回答) 70-80℃で行った。

質問23) 精製したバクテリオシンは耐熱性なのか。

(回答) 熱には強いと考えられる。

質問24) 何人から150株分離したのか。

(回答) 130名程度であった。

質問25) 皮膚に存在する菌なので顔にも存在するが、たまたま口に居ただけということはないのか。

(回答) *S. epidermidis* が口腔から分離されるという報告があり、定着していると考えられる。

質問26) KSE650 と *S. warneri* 間で *S. aureus* に対する抗菌活性に差があるが、アミノ酸配列の違いによるものか。

(回答) 本研究の結果から、アミノ酸配列の違いとバクテリオシンの産生量の違いによるものと考えられる。

質問27) *S. epidermidis* 由来のバクテリオシンは *S. aureus* には効果がないのか。

(回答) 本研究では条件を統一して行った結果、*S. aureus* に対する抗菌活性は認めなかった。

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。