

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 67 号	学位申請者	瀬戸口 大介
審査委員	主査	中田 匡宣	学位 博士 (医学 歯学 学術)
	副査	後藤 哲哉	副査 西谷 佳浩
	副査	松口 徹也	副査 西 恭宏

主査および副査の5名は、令和4年7月11日、学位申請者 瀬戸口 大介 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) アドヘジンは菌体表面に存在し、他の因子との付着に関与するものを指すのか？

(回答) アドヘジンは菌体と宿主細胞の付着に関与しており、*Candida albicans* も細胞壁表面に様々なアドヘジンが存在することが報告されている。

質問2) 本研究は、*C. albicans* の DMBT1 への結合に関与する菌体表層のアドヘジンを検索したということか？

(回答) これまで *C. albicans* の DMBT1 への結合は報告されていないため、菌体の DMBT1 および SRCRP2 への結合を確認した後、結合に関与するアドヘジンとして 25-kDa protein を菌体表層から精製した。

質問3) DMBT1 の正式名称は deleted in malignant brain tumors 1 であるが、由来は何か？

(回答) DMBT1 遺伝子が脳腫瘍の一つであるヒト髄芽腫細胞株において欠失していることに由来する。

質問4) どのような手法で、*C. albicans* から細胞壁タンパク質と細胞質タンパク質を分画したのか？

(回答) *C. albicans* をガラスビーズにて破碎後、遠心分離により細胞壁および細胞質タンパク質を分画した。

質問5) 今回提示しているデータのばらつきが少ないが、N数はいくらか？

(回答) N数は3であり、データは平均値±標準誤差を表示している。

質問6) これまでに口腔常在菌と DMBT1 の相互作用について、どのような知見が得られているか？

(回答) DMBT1 は *Streptococcus mutans* などの口腔レンサ球菌群、黄色ブドウ球菌、乳酸菌などの様々な口腔常在菌へ結合することが報告されている。

質問7) DMBT1 と結合する口腔常在菌の結合部位は共通しているか？

(回答) 口腔常在菌によって結合部位は様々であり、例として *S. mutans* は菌体表層蛋白質抗原である PAc を介して DMBT1 と SRCRP2 へ結合することが報告されている。

質問8) DMBT1 の精製過程で、*S. mutans* 由来タンパク質が混入している可能性はないか？

(回答) *S. mutans* と DMBT1 の特異的な結合を EDTA によって解除しているため、混入する可能性はほぼないと考えられる。

質問9) *C. albicans* の DMBT1 への結合において反応系に Ca^{2+} を添加した場合、無添加の場合と比較して、結合菌数が増加しているが、SRCRP2 では両者に有意差がないのはなぜか？

(回答) Ca^{2+} の存在により DMBT1 の立体構造が変化し、SRCRP2 領域が露出したため、*C. albicans* の DMBT1 への結合が増加したと考えられる。一方、菌体の SRCRP2 への結合に Ca^{2+} は影響を及ぼさないと考えられる。

質問10) 25-kDa protein が *C. albicans* 60S リボソームタンパク質 L10a と 56% の相同性を示すと記載されているが、L10a 以外の可能性もあるのか？

最終試験の結果の要旨

(回答) MALDI-TOF MS 分析の結果、最も高い相同性としてヒットしたのが L10a であった。

質問 1 1) DMBT1 は細胞膜には存在せず、すべて分泌されるのか?

(回答) DMBT1 は様々な組織の上皮細胞や線細胞に発現し、分泌型または細胞結合型として存在する。

質問 1 2) 液相 DMBT1 は *C. albicans* と反応しないという報告があると記載しているが、本研究では反応したのか?

(回答) 本研究では *C. albicans* の DMBT1 への結合において、反応系に DMBT1 を添加すると結合が抑制されたことから、液相 DMBT1 が *C. albicans* と反応したと考えた。

質問 1 3) 25-kDa protein の SDS-PAGE 像がかなり鮮明だが、精製は陰イオン交換クロマトグラフィーでフラクションを取っただけなのか?

(回答) 陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、菌体結合を抑制するフラクションを回収した。

質問 1 4) *C. albicans* 菌体表層成分の分離精製において、zymolyase を用いる方法と菌体をガラスビーズで破碎する方法を使用しているが、使い分けの理由はあるのか?

(回答) *C. albicans* の菌体表層に SRCRP2 への結合に関与する成分が存在すると考えたので、菌体細胞壁のみを選択的に抽出できる細胞壁溶解酵素である zymolyase を使用して、菌体表層成分の分離精製を行った。またガラスビーズは、菌体を細胞壁成分と細胞質成分に分画するために用いた。

質問 1 5) *C. albicans* が SRCRP2 へ強く結合している一方、他の DMBT1 ペプチドへ結合している可能性も十分考えられるが、なぜ SRCRP2 のみに注目したのか?

(回答) これまでの研究で、他の口腔細菌が SRCRP2 で強く結合することが報告されており、*C. albicans* も同様の結果が得られたため、以降 SRCRP2 を研究に用いた。

質問 1 6) SRCRP5 と SRCRP6 では Ca^{2+} の添加により *C. albicans* の結合菌数が有意に増加したが、この領域に糖鎖は存在するのか?

(回答) SRCRP5 および SRCRP6 に糖鎖が存在するかどうかは明らかにされていない。

質問 1 7) 25-kDa protein が L10a と 56% の相同性を示すと記載しているが、25-kDa protein で同定された配列が 56% という意味なのか、それとも明らかとなった配列が L10a と 56% 一致したという意味なのか?

(回答) 明らかとなった配列が L10a と 56% 一致したという意味である。

質問 1 8) ゲルろ過クロマトグラフィーで精製された DMBT1 の SDS-PAGE 像において複数のバンドが認められるが、同じ画分なのか?

(回答) 精製された DMBT1 は高分子糖タンパク質であり、結合している糖鎖の違いで幅広い大きさのバンドとして SDS-PAGE では観察される。

質問 1 9) DMBT1 の糖鎖修飾はどの部位に生じているか?

(回答) DMBT1 の糖鎖修飾部位については未だ解明されていない。

質問 2 0) *C. albicans* の DMBT1 への結合において、糖やレクチンを用いた結合抑制実験は行わなかったのか?

(回答) マンノースやシアル酸、レクチンを用いて結合抑制実験を行ったが、DMBT1 への結合抑制は SRCRP2 と比較して弱いものであった。

質問 2 1) *C. albicans* の DMBT1 への結合は、相対的な親和性はどの程度強いのか?

(回答) 今回 *C. albicans* の DMBT1 への結合が初めて確認されたため、他のタンパク質と比較しての親和性の程度に関しては検索していない。

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。