

論文審査の結果の要旨及び担当者

報告番号	博(歯)甲第133号	氏名	菊池 有一郎
論文審査担当者	主査教員	中山 浩次	
	副査教員	根本 孝幸	
	副査教員	藤原 卓	
論文審査の要旨			
<p>菊池有一郎は、平成 11 年 3 月長崎大学歯学部を卒業した後、同年 4 月に歯科医師国家試験して、歯学を専攻した。</p> <p>定められた期間に主科目として口腔免疫・感染症学特論，副科目として顎顔面矯正学特論を履修したほか、必修科目として 1 科目，選択科目 7 科目を履修し、合計 36 単位を取得した。所定の単位取得後、平成 15 年 11 月 6 日、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を、歯学研究科が主催した研究経過報告会で発表した。また、歯学研究科が行う語学試験（ドイツ語）には、平成 16 年 9 月 14 日に実施した筆記試験で合格した。</p> <p>学位論文の主論文として、「Novel stationary-phase-upregulated protein of <i>Porphy</i> (歯学)の学位を申請した。</p> <p>歯学研究科教授会は、これを平成 17 年 1 月 19 日の定例教授会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3 名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、平成 17 年 2 月 2 日 申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成 17 年 2 月 16 日の歯学研究科教授会で報告した。</p> <p>本研究は口腔偏性嫌気性細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. gingivalis</i>) の環境ストレス回避機構を解明する目的で、対数増殖期と静止期における全蛋白を二次元ゲル電気泳動法にて展開し、それぞれの蛋白の発現を比較検討したもので、論文の要旨は以下の通りである。</p> <p><i>P. gingivalis</i> 33277 株を嫌気培養し、対数増殖期、静止期における蛋白の発現量を二次元ゲル電気泳動法により解析した。対数増殖期に比べ、静止期において顕著に発現量が増加した蛋白 UstA の遺伝子について、プライマー伸長法にて転写開始点を同定し、さらにノーザンプロット解析にて転写物の大きさを解析した。さらに、</p>			

UstAに対する抗血清を得て、細胞分画法にて、UstA の局在を検討した。また、*ustA* 遺伝子挿入変異株およびその相補株を構築し、嫌気培養下における増殖曲線および二次元ゲル電気泳動法にて蛋白の発現量を比較検討した。野生株と比較すると *ustA* 遺伝子挿入変異株において発現量が顕著に増加する蛋白のうち、Sod については *sod'*-*lacZ* 融合遺伝子を作製し、その発現を調べた。最後に、野生株、*ustA* 遺伝子挿入変異株および相補株、*oxyR* 遺伝子挿入変異株、*ustA oxyR* 二重挿入変異株を用い、ディスク法にて種々の薬剤に対する感受性試験を行った。

P. gingivalis 33277 株を嫌気培養し、対数増殖期、静止期における蛋白の発現量を二次元ゲル電気泳動法により比較検討すると、対数増殖期に比べ、静止期において発現量が顕著に増加する蛋白が認められ、その蛋白を UstA と名付けた。次にプライマー伸長法にて転写開始点の同定を行い、さらにノーザンブロット解析にて転写物の大きさを解析したところ、*ustA* はモノシストロニックな遺伝子であることが判明した。また、*ustA* は酸素の存在により転写量が増加することがわかった。細胞分画法にて UstA の局在を調べたところ、UstA は細胞質中の蛋白であることがわかった。*ustA* 遺伝子挿入変異株および相補株を構築し、増殖曲線を作成すると、変異株は野生株に比べ静止期において濁度(O.D. 600nm)が約 0.3 減少した。また、その減少は相補株では顕著に抑制された。このことから、UstA は静止期におけるストレスに対し何らかの防御作用を与えている可能性が示唆された。野生株、変異株、相補株の静止期における嫌気または好気培養下の全蛋白を二次元ゲル電気泳動法にて展開してみると、酸化ストレスにより発現が誘導される蛋白である Sod、Tpx、Trx の発現量の顕著な増加が変異株においてみられた。この蛋白の対数増殖期における発現は、変異株は野生株に比べ酸化ストレスによる誘導を顕著に受けていた。このことより、UstA は酸化ストレス応答蛋白の発現を制御する可能性も示唆された。対数増殖期における Sod の発現を、*lacZ* をレポーター遺伝子として調べたところ、野生株に比べ変異株では酸化ストレスにより顕著に発現が誘導されており、二次元ゲル電気泳動法の結果とほぼ一致した。ディスク法による感受性試験の結果では、野生株に比べ変異株では diamide に対し耐性を示した。さらに、diamide, metronidazole, mitomycin C に対して、*ustA oxyR* 二重挿入変異株は *oxyR* 単独挿入変異株より耐性を示した。

本研究において、対数増殖期より静止期において顕著に発現量が増加する蛋白 UstA を発見した。UstA は、静止期におけるストレスに対し何らかの防御作用を与える可能性と、酸化ストレス応答蛋白の発現を制御する可能性が示唆された。

下記審査委員会は、本研究で得られた知見が、今後、歯学の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者

主査 教授 中山 浩次

副査 教授 根本 孝幸

副査 教授 藤原 卓