



Title	核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属細菌の検出に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松永, 光司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15191号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87259
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Matsunaga_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(工学) 氏名 松永 光司

審査担当者 主査教授 佐藤久
副査教授 岡部聡
副査教授 木村克輝
副査准教授 松下拓

学位論文題名

核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属細菌の検出に関する研究

(Study in detection of arsenic and *Legionella* spp. in the environmental water using nucleic acids)

持続可能な開発目標 (SDGs) の第 6 のゴールが「安全な水とトイレを世界中に」であるように、水質汚染の問題を解決することは依然として世界全体の課題である。汚染原因物質には大きく化学物質と微生物がある。これら汚染物質の分析には公定法と簡易分析法がある。公定法とは、成分の定性分析および定量分析を行う際、国際機関、国家もしくはそれに準ずる公定試験機関、研究所において指定された方法をいう。公定法の多くは、高い精度が求められるゆえに必然的に分析機器は高額となり、日常的な保守管理を含めると分析作業に要する業務の負担は大きい。しかしながら実際には水道水、下水処理水、工場排水の水質に関する情報をおおよそ把握したいというニーズがある。これに対し簡易分析法は、公定法で求められる煩雑な操作を省略することにより安価で、誰でも簡単に短時間に測定できるのが特徴である。

金属の簡易分析法の一つである光学的分析法は金属と選択的に結合する分子(プローブ)をサンプルに添加し、プローブが測定対象金属と配位結合した結果変化する光学的特性を分析することで金属濃度を測定する。しかしながらプローブが完全にターゲットの金属とのみ結合することではなく、他の金属とも結合してしまう。現在用いられている細菌分析法には培養に基づく方法、分子生物学的手法に基づく方法、顕微鏡にて直接観察する方法がある。培養に基づく方法は培養に少なくとも一日以上かかる、インキュベータ等の大型な機器を用いなければならないといった欠点がある。

そこで本研究では核酸をプローブとして用いた簡易分析法を開発することとした。核酸にはターゲット分子と特異的に結合する性質がある。現在のところ核酸をプローブとした水中の重金属分析方法は市販には至っておらず、水中の病原性細菌に至ってはプローブの開発段階の研究が主である。そこで本研究では核酸プローブによる簡易ヒ素分析法の開発とレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの選抜を試みた。

第 1 章では、研究背景、目的、これまでの先行研究についてまとめた。

第 2 章では As(III) をターゲットとした簡易 As(III) 分析法の開発を行った。各測定パラメーターの検討を実施した後に検出限界値 (LOD) を算出したところ、2.1 μM の LOD が得られた。その後、本手法で地下水中の As(III) 濃度を定量したところ、高濃度の As(V) や様々な金属カチオンを含む超純水、及び地下水中の As(III) 濃度を選択的に測定することができた。また、Ars-3 以外の塩基配列を持つ ssDNA を用いても As(III) を測定できた。このため、結果として本章で開発した簡易

As(III)分析法は、我々が予想していた反応とは異なる反応が生じている可能性が示唆された。

第3章では、As(V)をターゲットとした簡易As(V)分析法を開発、及び地下水への実用化を検討した。簡易As(V)検出法ではAs(V)を特異的に吸着させる酸化セリウムナノ粒子(CeO₂NPs)とフルオロセイン修飾一本鎖DNA(FAM-labeled DNA)を用いた手法を開発した。第2章と同様に、各測定パラメーターの検討を実施した後にLODを算出したところ、0.44 μMのLODが得られた。その後、地下水中のAs(V)を本手法で測定したところ、いくつかのサンプルは、本手法で測定したAs(V)濃度とICP-MSで測定した濃度がほぼ同じであることが示されたが、ほとんどの試料のAs(V)濃度は本手法では過小評価された。この原因は前処理試料中に存在するイオン(Na(I))によるもの、及び測定誤差によるものだと考えられる。また、第2章で開発した簡易As(III)分析法と組み合わせて、地下水中のAsを化学種毎に測定した結果、サンプルのAs(III)とAs(V)をそれぞれ定量できた。

第4章では、DNAアプタマーを用いたレジオネラ細菌(Lp(SG1))の簡易分析法の開発にあたり、Lp(SG1)結合型DNAアプタマーを開発した。従来の方法では、DNAアプタマーはSELEX法と呼ばれる手法で開発されるが、本研究ではSELEX法よりも高分離かつ短時間で選抜可能なPectI選抜法によってLp(SG1)結合型DNAアプタマーを選抜した。このPectI選抜法で獲得できたDNAアプタマーの配列は、先行研究における、従来のCell-SELEXで選抜されたDNAアプタマーと比較して低いK_d、k_{off}を持っており、平衡論的、反応速度論的にLp(SG1)と高い結合能を持ったDNAアプタマーを獲得できた。従って、先行研究で選抜されたDNAアプタマーよりもLp(SG1)と特異的に結合し、安定した複合体を形成するアプタマーであると考えられ、我々が目標としているバイオセンサーの開発に適したDNAアプタマーを選抜できたことが示された。

第5章では、結論であり、第2章から第4章で得られた知見についてまとめ、課題点及び今後の展望について述べた。

これを要するに著者は、核酸を用いて地下水中の三価と五価のヒ素を測定すること、およびレジオネラ細菌に結合するDNAアプタマーの選抜に成功しており、水環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。