



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	DNA修飾金ナノ粒子を用いた微生物核酸の簡易分析法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	中島, 芽梨
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第16352号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95059
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Meri_Nakajima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 中島 芽梨

学 位 論 文 題 名

DNA 修飾金ナノ粒子を用いた微生物核酸の簡易分析法の開発 (Development of Simple Analysis Methods for Nucleic Acids from Microorganisms using DNA-modified Gold Nanoparticles)

水環境工学分野において微生物の分析は、浄水処理における微生物のリスク評価、下水処理を担う微生物の管理、下水疫学調査、病原体による水環境汚染の実態の把握や感染症拡大の防止などに有用である。現在、日本の水道事業においては、培養法による一般細菌や大腸菌数の測定が日常的に行われている。また一部ではイムノアッセイによる硝化細菌の測定や、定量 PCR 法による下水疫学調査なども行われている。しかし、培養法は安価であるが分析に数日要するため検出対象に限られる。イムノアッセイは簡便であるが半定量的であり、抗体産生に動物を利用するため倫理的な問題がある。PCR 法は高い感度と特異性を持ち、多種多様な微生物やそれらが持つ特定の機能遺伝子を検出可能であるが、分析に時間、労力、コストを要する。日本の水道事業は職員の減少や採算性の悪化といった問題を抱えており、上記のような微生物の核酸分析を日常的に行うことはほぼ不可能である。そこで本研究では微生物の核酸を対象とした簡易分析法を開発することを目的とした。このような簡易分析法を開発することで、微生物の網羅的な分析が可能になり、水処理システムの安定的や最適化、事業者のコスト低減に貢献できる。さらに、これまで分析されてこなかった微生物や機能遺伝子等について分析が可能になることで、新たな知見の収集に寄与することができると考えられる。本研究では、金ナノ粒子に検出対象の核酸と特異的に結合（交雑）するプローブ DNA を修飾した「DNA 修飾金ナノ粒子（以下、金ナノ粒子プローブ）」を用いる分析法を開発した。金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴という特徴的な光学特性を持つため、粒子の状態によって特定の波長の光を吸収または散乱する。そのため、2 つの金ナノ粒子プローブが 1 つの核酸に交雑すると、金ナノ粒子の分散状態が変化しその光学特性が変化する。これを光学的に分析することで特定の核酸を検出または定量することができる。

第 1 章では、水環境工学分野において行われている微生物が有する核酸を対象とした分析法や、DNA 修飾金ナノ粒子を用いた核酸分析法に関する既往の知見についてまとめ、本研究の背景、目的について論じた。

第 2 章では、金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の反応メカニズムの詳細解明を行った。金ナノ粒子プローブと核酸の反応に影響を与える因子（粒子径、粒子とプローブ DNA 間のスペーサー長さなど）について最適化した。さらに、非検出対象の核酸の存在や、交雑部位の外側の塩基配列が分析に与える影響の検討、暗視野顕微鏡観察による粒子の分散状態の評価等を行った。これにより反応条件を最適化し、反応時の粒子の挙動を可視化することができた。

第 3 章では、紫外可視分光光度計を用いた吸光スペクトル測定による分析法（比色法）を開発した。比色法の検出原理について、試料溶液中に検出対象の核酸が含まれない場合は、凝集剤である NaCl 溶液を添加することで金ナノ粒子プローブが凝集し、溶液は赤色から青色へと変化する。試料溶液中に検出対象の核酸が含まれる場合は、金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の交雑によって凝集が

阻害され、溶液は赤色または赤紫色のまま、核酸が低濃度であるほど青色に近づいていく。溶液の吸光スペクトルを測定し、吸光度比（波長 620～700nm 付近の吸光度の値を波長 520 nm 付近の吸光度の値で除したもの、粒子径などによって変動する）を算出する。あらかじめ濃度既知のスタンダードを用いて検出対象の核酸濃度と吸光度比の値の相関式を作成し、これに濃度未知のサンプルの吸光度比の値を代入することで検出対象の核酸濃度を算出することができる。第 2 章にて最適化した条件のもとで、比色法を用いて下水処理場にて採取した活性汚泥中のアンモニア酸化細菌 (AOB) のモニタリングを行った。従来法である逆転写定量 PCR 法 (RT-qPCR 法) とほぼ同程度に定量可能であることが示された。また、比色法で用いる紫外可視分光光度計は、水質基準項目の測定に必要なためすでに処理場に設置されており、比色法は核酸の抽出が行えれば実処理場に導入可能であるといえる。比色法の分析コストは約 8 円/1 サンプルで、分析は核酸抽出後 5 分程度で完了した。

第 4 章では、光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトル測定による分析法 (光導波路法) を開発した。前章で開発した比色法は簡便さや分析時間の点で優れていたが、検出下限が高く、病原体や低濃度の核酸の検出が困難であるという課題があった。そこで、微量の物質を高感度で検出可能な光導波路分光装置を用いた分析法を開発することで高感度化を試みた。光導波路法の検出原理について、台形のスライドガラスのような導波路ガラス上に金ナノ粒子プローブが分散して存在している場合は、基底状態の散乱光が観察される。試料溶液中に検出対象の核酸が含まれている場合は、交雑によって金ナノ粒子が近接することで散乱光強度が増大する。測定条件の最適化を行ったのち、腸管出血性大腸菌 O157:H7 が持つ eae 遺伝子の mRNA や臨床検体中の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のゲノム RNA の検出を行った。SARS-CoV-2 のゲノム RNA の検出では、RT-qPCR 法の Ct 値から定義された陽性サンプルと陰性サンプル (Ct 値 ≥ 37) について、散乱光強度の低下やスペクトルのピーク波長のシフトから判別可能であった。また、光導波路法の検出下限は、これまでに報告されている金ナノ粒子プローブと CRISPR-Cas システムを利用した酵素を必要とする分析法などとほぼ同等であった (人工合成ゲノム RNA: 1 copies/ μ L, 臨床検体中ゲノム RNA: 30 copies/ μ L)。また、独自の測定条件を確立したことで、既往の光導波路分光装置を用いた分析法と比較して検出感度が 1000 倍程度向上し、10 copies/ μ L 程度の非常に低濃度な核酸の検出に成功した。

第 5 章では、ペーパーチップとスマートフォンを用いた画像撮影による分析法 (ペーパーチップ法) を開発した。本法はイムノクロマト法の原理を応用して、検出ライン上に抗体ではなく核酸であるプローブ DNA を固定したペーパーチップにより検出を行う。試料溶液中に検出対象の核酸が含まれる場合は、プローブ DNA・核酸・金ナノ粒子プローブの複合体が形成されることで検出ラインは赤色に呈色する。検出対象の核酸が含まれない場合は、金ナノ粒子プローブが検出ライン上を通過するため、色は変化しない。試料溶液を滴下したペーパーチップについて、スマートフォンで画像を撮影し、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて滴下地点からの距離と平均輝度値のプロファイルについて分析した。検出対象である細菌の 16S rRNA を含む RNA サンプル (RNA)、これを RNA 分解処理したもの (RNA-NC)、核酸を含まないサンプル (Blank) で分析を行ったところ、RNA のみ検出ライン上にピークが見られた。また、RNA-NC と Blank のプロットはほぼ一致しており、ピークは検出ラインよりも下流側に存在し、金ナノ粒子プローブや非検出対象の核酸が検出ラインを通過していることが示された。よって、本研究で作成したペーパー分析チップは、検出ラインの色の变化から核酸を検出可能であることが示された。

第 6 章では、本研究で得られた知見を総括としてまとめ、課題と今後の展望についても示した。