



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_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 中島 芽梨

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 押木 守
副 査 教 授 渡慶次 学 (総合化学院)

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。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。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。

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。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。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。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。検出対象である細菌の 16SrRNA 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。

これを要するに、著者は金ナノ粒子プローブを用いた微生物核酸の簡易分析法の環境試料への適用を目指し、吸光スペクトル測定および光導波路分光測定に関与する反応メカニズムを明らかにするとともに、測定条件を最適化し、環境試料中の核酸を従来法に比べて短時間に同程度の感度で分析した。これは水環境工学の発展に寄与するところ大である。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があるものと認める。