

高知大学学位授与記録

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲総科博第45号	日野 ひかり	海水起源マンガングラストの構造および組成の時間的変化に関する地球科学的考察	1
甲総科博第46号	中村 力也	原生生物繊毛虫コルポータ (<i>Colpoda cucullus</i>) の休眠シスト形成過程におけるシグナル伝達および休眠シストの耐性に関する研究	4
甲総科博第47号	生田 雄己	表面修飾ジルコニアの特性とその応用に関する研究	7
甲総科博第48号	今井 斉志	バクテリオファージを利用した細菌検査法の開発に関する研究	10
甲総科博第49号	関田 慎也	機能性蛍光ナノエマルジョンの作製と細菌検出への応用	13

論文の内容の要旨

海水起源マンガングラスト（以下、クラスト）は、鉄、マンガン酸化物を主成分とし、世界中の海山や海嶺に広く分布する化学堆積岩である。副成分として、コバルト、ニッケル、白金などのハイテク産業に欠かせない有用金属を含むことから、将来の鉱物資源として期待されている。また、100万年に数mmから数cmの非常に遅い速度で海水から直接沈殿して形成される「海水起源」であることから、長レンジの古海洋環境や地質イベントを記録するコア試料としても研究されている。特に、北西太平洋では広い水深・海域で分布が確認されているものの、その産状や組成の地域特性、およびその地球科学的規制要因はよくわかっていない。本研究では、クラストを古海洋環境の変遷や地質イベントを記録した長レンジの堆積物コアとみなして、広大な海域から得た試料の微細スケールの成長構造や鉱物・化学組成を記載した。

その結果、太平洋の多様な海域で採取されたクラストにおいて、微細層序学的な対比が成り立つことがわかり、クラストの構造・組成の時空間的多様性を規制する地球科学的要因が指摘された。具体的には、次のような多様な距離スケールでの特徴が明らかとなり、クラストの時空間的変化は海山の形成史や古海洋環境と強く関係することが示唆された。

- (1) 1つの海山を対象とした音響調査や多数の掘削コアの記載に基づいて、海山の地形・地質とクラスト層序の変化を比較した結果、クラストの成長は、基盤となる礫岩等の不安定性や有孔虫砂の堆積などの、海山の形成史や地質環境の変化と強く関連する事が示唆された (Hino et al., 2023)。
- (2) 数百 km スケールの海域内の 6 海山を対象に、クラストの微細層序学的記載（微細構造、鉱物・化学分析、年代測定）を行った結果、クラストの層序は、離れた海山間でもよく対比され、類似した環境変化を記録していることが明らかとなった (Hino & Usui, 2022)。
- (3) 太平洋プレートからフィリピン海プレートにいたる東西 3,000km 以上の直線距離に位置する 7 海山のクラストを対象に上記の層序学的記載・対比を行った結果、時間軸において共通した 3 つの重要な特徴（リン酸塩化層の境界年代、Co/Mn 等の化学組成の時間変化、砕屑物供給の時間変化）が認められ、その要因は広域的な古海洋環境と強く関連していることが推定された (Hino & Usui, 2023)。

以上の成果は、クラストから読み取る全地球的な地球科学現象や新生代の古海洋環境解読への展開が期待される。また、クラストの産状と海山の地形・地質との関連も示唆されており、将来の資源探査における有望エリアの選定や資源量評価の精度向上への貢献も期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、北西太平洋域に広く分布するマンガンクラスト（以下、クラスト）の多様性の実態把握と地球科学的規制要因の解明を目的としている。本研究は、クラストを成長速度の遅い堆積物みなして、広大な海域から得た多数のクラスト試料を微細層序学的視点から見直し、様々な距離スケールでの変化や対応関係を読み解く、という新たな視点を追求したものである。微細層序学的検討により、数 mm から数 1000 km にいたるスケールにおいて層序対比が成り立つことがわかり、クラストの構造・組成の時空間的多様性を規制する地球科学的要因の考察が可能となったことが大きな進歩である。

主要な成果は、3編（筆頭著者）の原著英語論文として、査読付国際誌(Marine Geology など)に簡潔にまとめられている。具体的には、1)短いスケールでは、1 海山での多数の掘削コアの記載により、海山の微地形・地質とクラスト層序の変化が、基盤の火山岩・石灰岩等の安定性や堆積環境の変化と強く関連する事が示唆され、2) 数百 km スケールでは、我が国のクラスト鉱区内の 6 海山において、クラストの層序は、離れた海山間でよく対比され、類似した環境変化を記録している、そして 3) 太平洋を横断する 1000km スケールでも、7 海山のクラストで上記の層序学的対比が読み取れた。以上、クラストは堆積物コアとしての意義が確認されたことは大きな進歩である。

さらには、これらの対応関係は、クラストの資源量解析や新鉱床発見などの現場においても活用することができることも示唆された。

これらのことから上の博士論文を審査した結果、学位申請者日野ひかりは、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

<p>ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p>	<p>なかむら りきや 中村 力也(高知県) 博士(理学) 甲総科博第46号 学位規則第4条第1項該当 令和6年3月22日 原生生物繊毛虫コルポータ (<i>Colpoda cucullus</i>) の休眠シスト形成過程におけるシグナル伝達および休眠シストの耐性に関する研究</p> <p>発表誌名 Journal of Protozoology Research. 30: 38-46. 2020.</p> <p style="text-align: right;">審査委員 主査 教授 有川 幹彦 副査 教授 遠藤 広光 副査 准教授 宇田 幸司</p>
---	---

論文の内容の要旨

原生物織毛虫コルポーダの陸上環境への適応戦略は、休眠シストを形成することである。コルポーダは、生息に適した水環境下では栄養細胞として分裂、増殖を繰り返す。しかし、環境の悪化を感知すると、乾燥、高温、凍結などのさまざまな環境刺激に耐性をもつ休眠シストを形成する。これをシスト化という。近年のトランスクリプトーム解析により、コルポーダの休眠シスト形成の初期過程に活性化する細胞内シグナル伝達経路の中で、5'-AMP activated protein kinase (AMPK) が重要なはたらきをしていることが示唆された。しかし、AMPK タンパク質の発現やリン酸化、さらには休眠シスト形成におけるはたらきは実際には確かめられていない。そこで本研究では、コルポーダにおける AMPK の発現を確認し、さらには休眠シスト形成の初期過程におけるはたらきを明らかにすることを目的として実験を行った。得られた成果は第 1 章にまとめた。一方、上述したように、コルポーダの休眠シストはさまざまな環境耐性をもつ。本研究では、コルポーダの生息環境における pH に着目し、休眠シストがもつ酸耐性を評価し、その獲得機構について明らかにすることを目的として実験を行った。得られた成果は第 2 章にまとめた。

第 1 章では、ウェスタンブロット解析によるタンパク質発現解析を行い、コルポーダの栄養細胞が AMPK を発現していることが確認された。さらには、Phos-tag 化学発光解析によるタンパク質のリン酸化解析を行い、AMPK 活性化剤を加えることで AMPK の自己リン酸化レベルが上昇するとともに、他の多くのタンパク質のリン酸化レベルも上昇することが確認された。そこで、AMPK の活性化および活性阻害の休眠シスト形成への影響を検討した。その結果、AMPK 活性化剤を加えると、休眠シスト形成の非誘導条件下および誘導条件下のいずれの場合においてもシスト化率が有意に上昇した。一方、AMPK 阻害剤を加えると、シスト化率が有意に低下した。さらには、feeding RNAi 法により AMPK 遺伝子をノックダウンした細胞では、シスト化率が有意に低下した。これらの結果から、AMPK は休眠シスト形成の初期過程において活性化することで自身を含む多くのタンパク質をリン酸化し、休眠シスト形成を促進させることが明らかになった。

第 2 章では、まず、休眠シストの酸耐性を評価した。コルポーダの栄養細胞は pH 7 の中性溶液中でのみ生育可能であったのに対し、休眠シストは pH 1 の強酸溶液 (0.1 M HCl) に数時間曝露しても生存していた。この酸耐性は、休眠シスト形成誘導後 4 日間かけて徐々に獲得された。休眠シストの酸耐性獲得機構を明らかにするために、強酸溶液曝露の休眠シスト内 pH への影響について検討した。pH 指示薬を用いて休眠シストを強酸溶液 (pH 1) に曝露した時の休眠シスト内 pH を測定したところ 5.9 であった。その理由として、休眠シスト細胞膜のプロトンの透過性が低くなっていることが考えられた。そこで、イオノフォアの一つでプロトンの膜透過性を増加させるプロトノフォア存在下で休眠シストを強酸溶液に曝露した。これにより、プロトンを強制的に休眠シスト細胞内に流入させたと、酸耐性が著しく低下した。このことから、コルポーダは休眠シスト形成過程において、細胞膜のプロトン透過性を徐々に低下させてプロトンの細胞内への流入を抑制することで酸耐性を獲得している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

原生物纖毛虫コルポーダは、環境の変化に応じて栄養細胞から休眠シストへ（シスト化）、あるいは休眠シストから栄養細胞へ（脱シスト）と形態を変化させる。そして形成された休眠シストはさまざまな刺激に対して耐性をもつ。本研究は、1) 休眠シスト形成初期過程における 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) のはたらきと、2) 休眠シストの酸耐性とその獲得機構について調べた。その成果として、1) においては、コルポーダの栄養細胞が AMPK を発現していること、AMPK の活性化により AMPK 自己リン酸化レベルが上昇し、他の多くのタンパク質のリン酸化レベルも上昇すること、AMPK の活性化剤はシスト化率を上昇させる一方で阻害剤は低下させること、そして AMPK 遺伝子のノックダウンによりシスト化率が低下することを明らかにした。これらのことから、AMPK は休眠シスト形成の初期過程において活性化することで自身を含む多くのタンパク質をリン酸化し、休眠シスト形成を促進させることを明らかにした。また、2) においては、休眠シストは pH 1.0 の強酸溶液 (0.1 M HCl) に数時間暴露しても生存すること、このような酸耐性は休眠シスト形成誘導後数日間かけて獲得されること、強酸暴露時の休眠シスト内 pH は 5.9 であること、そしてプロトンの強制的流入により酸耐性が低下することを明らかにした。これらのことから、コルポーダは休眠シスト形成過程において、細胞膜のプロトン透過性を徐々に低下させてプロトンの細胞内への流入を抑制することで酸耐性を獲得している可能性を示した。

以上の結果を含む研究成果は、原著論文として、査読付きの国際的学術雑誌 5 編（うち筆頭著者 1 編、*Journal of Protozoology Research*, 2020, 30: 38-46.）としてまとめられている。このように、本研究は、原生物纖毛虫コルポーダの休眠シスト形成過程におけるシグナル伝達の一部を明らかにし、さらには休眠シストの酸耐性とその獲得機構の一端を明らかにしたものであり、原生物における環境応答の分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者中村力也は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

論文の内容の要旨

本学位論文の研究では、ジルコニア (ZrO_2) が耐熱性・耐薬品性・機械的強度に優れているだけでなく、フッ化物イオン (F^-) やリン酸イオンのようなルイス塩基に対して強い相互作用を示すことに注目し、界面活性剤や生体分子を固定化した表面修飾ジルコニアの構築を行った。この材料をクロマトグラフィーの固定相に適用し、分子選択性を評価した。その結果、これまでの固定相とは異なる特異的な保持挙動を示すことを見出した。これらの成果を本論文にまとめた。本論文の第1章では、序章としてジルコニア及びリン脂質の基礎的な物性と応用と本研究の目的を、第2章では、陰イオン交換基を修飾したジルコニア固定相に対する無機陰イオンの保持特性を、第3章では、リン脂質固定化ジルコニアの開発と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 固定相への応用を述べ、第4章に本研究のまとめを述べる。ここでは、本論文の中心となる第2章と第3章を概説する。

第2章： ZrO_2 は、耐熱性・耐薬品性・機械的強度に優れていると同時に、ルイス酸塩基反応に基づく多様な表面修飾が可能であることから、HPLCの固定相として利用する研究が行われている。HPLCの一種であるイオンクロマトグラフィー (IC) の課題として、 F^- の分離能が低いことが挙げられる。 F^- はイオン交換基との相互作用が小さく、一般的な陰イオン交換カラムではほとんど保持されないために試料中の夾雑成分との分離が困難である。

先行研究では、ICの固定相として ZrO_2 を利用することで、配位子交換作用に基づく F^- の選択的な分離を達成したが、 I^- や NO_3^- のような無機陰イオンの分離能は低かった。そこで、本研究では、陰イオン交換基を有するトリメチル[3-(トリメトキシシリル)プロピル]アンモニウムクロリド (TMA) をシランカップリングによって ZrO_2 表面に修飾したTMA- ZrO_2 を合成した。これをICの固定相として用いた結果、TMAの修飾量を制御し、 ZrO_2 の配位子交換作用とTMAのイオン交換作用を同時に発現させることによって、 F^- の保持力を大きくした無機陰イオンの同時分離法を開発するに至った。この成果はIC並びにイオン分析法の利用領域の拡大に繋がることが期待される。

第3章： ZrO_2 のルイス酸としての特性を活かし、リン脂質修飾 ZrO_2 の開発を行った。リン脂質は自己組織化した脂質二重層として生体膜中に存在し、様々な生体内反応に関与することが知られている。ガラスや金等の固体基板上にリン脂質二重層を作製し、生体内相互作用を解明する研究が行われているが、基板とリン脂質間を繋ぐ特殊な試薬が必要とされることが多く、利用範囲が限定されることが課題である。

そこで、本研究では、 ZrO_2 とリン酸基との強いアフィニティーを利用することでリン脂質層を ZrO_2 に直接修飾した材料を開発し、その物性評価を行った。赤外分光光度計 (FT-IR) や熱重量分析 (TG-DTA) の結果から、リン脂質のモデル物質として大豆由来レシチンを用い、イソプロパノールと水の混合溶媒中で ZrO_2 を1時間反応させるだけでレシチン修飾 ZrO_2 (LMZ) を合成できることを見出した。次に、LMZをHPLC用カラムに充填し、芳香族化合物及びアミノ酸との相互作用を評価すると、芳香族化合物ではリン脂質の炭素鎖との疎水性相互作用に基づく分離が得られ、アミノ酸ではリン脂質の極性基あるいは ZrO_2 表面の電荷の静電的相互作用に基づく分離が得られた。また、50回以上の繰り返し分析を行ったところ、芳香族化合物の保持時間の相対標準偏差は5%未満であり、リン脂質層が高い安定性を有することが示された。

論文審査の結果の要旨

生田雄己は、応用自然科学専攻に入学後、生命科学に資する分離材料を開発することを目的に、物理的・化学的に安定な金属酸化物である酸化ジルコニウム（ジルコニア）の表面に、陽イオン性の官能基を結合させた陰イオン交換体と、リン脂質（レシチン）を結合させた機能性材料を合成し、そのイオン及び分子選択性についてクロマトグラフィーを用いて評価した。

本学位論文は、これらの研究成果をまとめている。第1章は本研究に至った経緯、課題、研究目的を中心に構成されており、第2章は「陰イオン交換基を修飾したジルコニア固定相に対する無機陰イオンの保持特性」について、第3章は「リン脂質固定化ジルコニアの開発と有機物質に対する保持特性」について、第4章は前章までに述べられた成果をまとめた結言を述べている。

第2章では、陰イオン交換体を有するジルコニアを、イオンを分離する分析手法であるイオンクロマトグラフィー（IC）の分離剤として用い、従来困難であったフッ化物イオンの選択的吸着分離と、塩化物イオンのような環境水中に主要なイオン成分のイオン交換分離を同時に発現させることに成功した内容について述べている。この成果は、2022年12月の国際学会（Asia Pacific Symposium on Ion Analysis）で口頭発表（英語）され、その後国際誌 Analytical Sciences に掲載され、同誌の Hot Article Award（優秀論文賞）の受賞に至っている。

第3章では、レシチンを表面修飾したジルコニアが、有機溶媒中でレシチンとジルコニアを混ぜるだけで、化学的に安定なレシチン修飾ジルコニア（LMZ）を合成できることを見出したことを述べている。また、LMZの分子認識能を評価するため、有機化合物を分離する分析手法である高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の分離剤として用い、芳香族化合物に対しては疎水性相互作用によって、アミノ酸に対しては静電的相互作用によって認識することを突き止めた点も述べられている。LMZが有する独自の分子認識能の発見は、発表者本人の鋭意努力によって得られた成果といえる。この研究成果は、現在アメリカ化学会の国際誌に投稿中であり、今後、生化学、医学や環境科学への利用が期待できる。

本学位論文に述べた表面修飾ジルコニアは、これまで生理代謝機構を解明するために用いられていた分離剤や化学センサーにおいて課題となっていた材料の作製時の煩雑さや、それに伴って生じる個体差を解消できる合成法並びに分離材料となりうる。また、レシチンだけでなくDNAやリン酸含有化合物の足場になりうることも記している。さらに、ジルコニアそのものが、これまで生体関連物質の足場としていたシリカゲル、酸化チタン等とは異なった相互作用を示すことも明らかにしており、生化学、医学、環境に関連する分離科学分野に重要な知見を与えたものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者 生田雄己は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

<p>ふりがな</p> <p>氏 名 (本籍)</p> <p>学 位 の 種 類</p> <p>学 位 記 番 号</p> <p>学位授与の要件</p> <p>学位授与年月日</p> <p>学位論文題目</p> <p>発 表 誌 名</p>	<p>いまい まさし</p> <p>今井 斉志 (大阪府)</p> <p>博士 (理学)</p> <p>甲総科博第 48 号</p> <p>学位規則第 4 条第 1 項該当</p> <p>令和 6 年 3 月 22 日</p> <p>バクテリオファージを利用した細菌検査法の開発に関する研究</p> <p>Highly specific and sensitive detection of bacteria by dark-field light-scattering imaging based on bacteriophage-modified magnetoplasmonic nanoparticles</p> <p>Masashi Imai, Jumpei Uchiyama, Iyo Takemura-Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Yosuke Niko, Shingo Hadano, Shigeru Watanabe</p> <p>Bulletin of the Chemical Society of Japan</p> <p>Volume 97, Issue 2, February 2024, uoad010</p> <p>https://doi.org/10.1093/bulcsj/uoad010</p> <p style="text-align: right;">審査委員</p> <p style="text-align: right;">主査 教授 渡辺 茂</p> <p style="text-align: right;">副査 教授 和泉 雅之</p> <p style="text-align: right;">副査 教授 森 勝伸</p>
---	--

論文の内容の要旨

本論文は、細菌に感染するバクテリオファージ（以下、ファージと省略）の高い宿主特異性を利用し、ファージを固定化した複合ナノ粒子を用いた細菌の高選択的な検出に関する研究をまとめたものである。

本論文は2つの章より構成されており、以下に各章の概要を述べる。

第1章では、細菌検査法におけるファージの応用について広く概説した。ファージを利用した細菌検査法としてファージの感染および感染産物を検出する方法、ファージを基板上に高度に集積化させ、捕捉した細菌情報を物理信号に変換して検出する方法、ファージを細菌検出用バイオセンサーの細菌認識部位として利用する方法の3項目に大別し解説した。さらに、多様な応用例を通じてファージの高い宿主特異性や有機溶媒、pH変化、温度などの環境変化に対する高い安定性、また遺伝子操作によりファージ表面に各種官能基や分子を提示できる構造修飾の容易性など、細菌検出に焦点を当て新奇なバイオマテリアルとして、ファージのユニークな特性について解説した。また、細菌検査への応用に向けファージが抱える課題について検討し、これら課題を克服しファージの特性を活かした新たな細菌検出技術の可能性について考察した。

第2章では、磁性と光散乱特性を併せ持つ磁性プラズモニックナノ粒子の合成と細菌検出への応用について検討した。はじめに磁性プラズモニックナノ粒子の合成法と磁性プラズモニックナノ粒子表面へのファージの固定化法を確立した。ファージ修飾磁性プラズモニックナノ粒子（以下、プローブと省略）の磁気特性を利用して標的細菌の磁気分離を達成するため、粒子表面を被覆したファージの修飾量と細菌の磁気分離効率の相関関係について検討した。ファージの修飾量を最適化することで、高効率で定量的に標的細菌を磁気分離できることを明らかにし、作製したプローブが優れた磁気分離キャリアであることを実証した。続いて、プローブの細菌特異性について検証した。ブドウ球菌属の *S. aureus*（標的細菌）と *S. pseudintermedius* およびエスケリア属の *E. coli* の3種類の細菌を含む細菌混合溶液にプローブを添加し、暗視野顕微鏡で観察した。標的細菌の *S. aureus* にはのみプローブが吸着し、強力な散乱光を放出している様子が確認され、本手法が種レベルで細菌を識別できる高選択的な細菌検出法となることを示した。さらに両手法を組み合わせ磁気分離後、濃縮された標的細菌を暗視野顕微鏡で観察することで、 10^2 – 10^8 cfu ml⁻¹ の検出範囲で *S. aureus* を定量的に検出できることを明らかにした。また、検出限界値は 254 cfu ml⁻¹ に達し、高選択的かつ高感度で細菌を検出できることを実証した。本手法は修飾するファージを変えることで多様な細菌種を検出することが可能であり、ヘルスケアをはじめとした環境モニタリングへの応用の可能性を秘めていることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、バクテリオファージ修飾磁性プラズモニックナノ粒子の作製と細菌の選択的検出に関する研究成果をまとめたものであり、以下に示す主要な成果を得ている。

(1) バクテリオファージを利用した細菌検出法について系統的かつ詳細な解説を行っている。特にファージを新規なバイオマテリアルとして着目し、その有益性と課題について独自の視点を提供している。この解説は、ファージをバイオセンサーの細菌認識部位として利用する可能性に関する新たな知見をもたらしている。

(2) シリカナノ粒子上に FePt 磁性ナノ粒子を結合させた後、カチオン性高分子と金ナノ粒子を交互積層させることで、磁性プラズモニックナノ粒子を合成し、その表面に静電的相互作用を活用してファージを固定化する方法を確立した。

(3) 粒子表面に修飾されたファージの修飾量と細菌の磁気分離効率との相関関係について検討しており、ファージ修飾量を最適化することで、定量的に細菌を磁気分離できることを示し、細菌の磁気分離効率を向上させる重要な知見を提供した。

(4) 細菌とバクテリオファージ修飾磁性プラズモニックナノ粒子の混合比と細菌の磁気分離効率との相関関係について検討し、最適混合比で 95% の細菌を磁気分離できることを示した。

(5) 暗視野顕微鏡下、ファージ修飾磁性プラズモニックナノ粒子が結合した細菌から強力な散乱光が観察されることを見出した。細菌-ナノ粒子の混合比と細菌の散乱光強度との相関関係について検討し、最適混合比で散乱光強度が飽和に達すること示した。これらの結果から細菌の散乱光強度が金ナノ粒子の結合に依存することを明らかにした。

(6) *S. aureus* を宿主とする S13' ファージを修飾した磁性プラズモニックナノ粒子が *S. aureus* にのみ結合することを実証した。これにより、菌種レベルで細菌が識別できることを示し、高い選択性を有する新しい細菌検出手法を提供した。

(7) 標的細菌を磁気分離後、暗視野顕微鏡下で観察することで 10^2 – 10^8 CFU ml⁻¹ の検出範囲で定量的な細菌の検出を実現し、検出限界値は 254 CFU ml⁻¹ に達することを明らかにした。本手法が異なるファージを用いることで多様な細菌種を定量的に検出できる可能性を示した。

以上の結果は、原著論文として、審査付きの国際学術雑誌に 1 編（うち筆頭著者論文 1 編）としてまとめられている。本研究は、学際的なアプローチと高度な技術を結集し、ファージ修飾磁性プラズモニックナノ粒子を用いた新しい細菌検出手法を開発している。これによって感染症の診断や環境モニタリングなどの分野での新しい展開が期待され、学術的にも大いに価値のある研究と評価される。よって、学位申請者である今井齊志は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

ふりがな	せきだ しんや
氏名(本籍)	関田 慎也 (高知県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	甲総科博第49号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	令和6年3月22日
学位論文題目	機能性蛍光ナノエマルジョンの作製と細菌検出への応用
発表誌名	<p>Bacteriophage-Conjugated Fluorescent Nanoemulsion as a Novel Optical Probe for Highly Selective Bacterial Detection</p> <p>Shin-ya Sekida, Takatoshi Chisaka, Jumpei Uchiyama, Iyo Takemura-Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Yosuke Niko, Shingo Hadano, Shigeru Watanabe</p> <p>Bulletin of the Chemical Society of Japan</p> <p>Volume 96, Issue 11, November 2023, Pages 1234–1242</p> <p>https://doi.org/10.1246/bcsj.20230200</p>
	<p>審査委員</p> <p>主査 教授 渡辺 茂</p> <p>副査 教授 和泉 雅之</p> <p>副査 教授 森 勝伸</p>

論文の内容の要旨

本論文は、高輝度蛍光性ナノエマルジョンとバクテリオファージのバイオコンジュゲーション技術および作製したファージ修飾蛍光性ナノエマルジョンを細菌検出に応用する方法についてまとめたものである。

本論文は二つの章で構成されており、それぞれ以下に各章の概要を示す。

第一章では、生命科学分野におけるナノエマルジョンの重要性や応用例について広く概説した。ナノエマルジョンは疎水性分子を大量に内包できる高い包摂力と優れた生体適合性を有する機能性ナノ粒子として注目されている。ドラッグデリバリーや蛍光イメージングなど生命科学分野を中心にナノエマルジョンの多岐にわたる応用例を通して、ナノエマルジョンのユニークな特性について解説した。特に、その特性を活かした蛍光性ナノエマルジョンが、既存の蛍光プローブに代わって注目を集めている研究例に焦点を当て解説した。ナノエマルジョンをより広範な研究分野へ応用するには、新たな表面修飾法の開発や高輝度化等の課題を克服する必要がある、その解決策について解説した。さらに、これら課題を克服することで開かれるナノエマルジョンの新たな可能性について、細菌検出への応用を中心に考察した。

第二章では、バクテリオファージを活用した蛍光性ナノエマルジョンの機能化と細菌検出への応用について検討し、細菌検出用蛍光プローブとして蛍光性ナノエマルジョンの有用性を明らかにした。主な研究内容は次のとおりである。

- ① ナノエマルジョンの表面に導入したカルボキシ基とバクテリオファージの結合方法を検討し、蛍光性ナノエマルジョンのバイオコンジュゲーション技術を確立した。
- ② 細菌検出に有用なファージ修飾蛍光性ナノエマルジョンを作製するため、色素含量やナノエマルジョン表面に導入されたカルボキシ基の数および蛍光性ナノエマルジョンとバクテリオファージの混合比について最適化した。
- ③ 作製されたプローブを種々の細菌と混合した後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。プローブは市販の色素系蛍光プローブを大幅に上回る輝度と耐光性を示すとともに、プローブが宿主細菌である *S. aureus* に吸着し、宿主細菌とは属の異なる *E. coli* や同種の *S. pseudintermedius* でも非宿主細菌に対しては吸着しないことを確認した。この実験によって宿主細菌に結合したプローブの発する蛍光を介して、属からさらに種レベルで細菌を正確に識別できることを実証した。
- ④ 検出範囲が 10^4 – 10^8 CFU mL⁻¹、検出限界値は 8.3×10^4 CFU mL⁻¹ であることを突き止めた。

これらの実験結果から粒子系蛍光プローブとしてファージ修飾蛍光性ナノエマルジョンを利用する本手法が、正確かつ再現性の高い標的細菌の同定を可能にするとともに、信頼性の高い定量的な細菌検出に利用できることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ナノエマルションの光機能化とバクテリオファージとのバイオコンジュゲート技術の開発および分析化学的応用に関する研究成果をまとめたものであり、以下に示す主な成果を得ている。

(1) エマルションに関する分類法、作製法、構成物質、安定性などについて系統的かつ明瞭な解説を提供している。特に蛍光プローブとして有望な数十～数百ナノメートルサイズの蛍光ナノエマルションに焦点を当て、細菌検出分野への応用展開に向け未解決の技術的課題を示しており、新しい蛍光プローブの設計において重要な指針を提供している。

(2) 先行研究の知見をもとに凝集状態にあっても高い輝度を保つ蛍光色素を利用し、高濃度の蛍光色素をナノエマルションに内包させ、輝度の高い蛍光ナノエマルションを開発しており、高輝度化の重要な技術的手法を提案している。

(3) バクテリオファージとの結合において重要となるカルボキシ基の制御に焦点を当てた。具体的には、カルボキシ基修飾界面活性剤と未修飾界面活性剤の共混合により、一定数のカルボキシ基をナノエマルション表面に導入できる手法を示した。さらに、カルボキシ基の数や蛍光ナノエマルションとファージの混合比の最適化を通じて、ファージ修飾蛍光ナノエマルションが得られることを示した。

(4) *S. aureus* を宿主とする S13'ファージを修飾したファージ修飾蛍光ナノエマルションは、*S. aureus*をはじめ菌属の異なる *E. coli* ほか 4 種の細菌や同属の *S. pseudintermedius* ほか 4 種の細菌と混合しても *S. aureus* にのみに結合し、蛍光顕微鏡下、*S. aureus* から緑色の蛍光スポットが観察された。この手法により宿主細菌に結合した蛍光ナノエマルションの発する蛍光を介して、菌属からさらに菌種レベルで細菌を正確に識別できることを示しており、高感度で特異的な細菌検出法を提供し、感染症診断に新しい展望をもたらしている。

(5) ファージ修飾蛍光ナノエマルションは、市販の色素系蛍光プローブを上回る輝度と耐光性を示すとともに、検出範囲 (10^4 – 10^8 CFU mL⁻¹)、検出限界値 (8.3×10^4 CFU mL⁻¹) においても優れた性能を示した。これは、標的細菌の正確で再現性の高い同定を可能にし、信頼性の高い定量的な細菌検出に利用できることを示唆している。

以上の結果は、原著論文として、審査付きの国際学術雑誌に 1 編（うち筆頭著者論文 1 編）としてまとめられている。本研究は、ナノエマルションを活用した細菌検出用蛍光プローブの新たな応用分野を開拓するとともに、新規な検出システムに関する重要な知見を提供している。よって、学位申請者 関田慎也は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。