

論文審査の結果の要旨

学位申請者 山口 剛 士

本論文は、「酵素反応を用いない蛍光増幅法 (hybridization chain reaction 法) による微生物の視覚的検出技術の開発と環境微生物への適用」と題し、7章より構成されている。

第1章では、本研究における研究背景及び目的について記述している。

第2章では、微生物の視覚的検出技術の適用報告例、問題点等を記載し、hybridization chain reaction (HCR) 法の基本的知見について記述している。

第3章では、純粋菌株を用いてその技術の開発について記述している。開発した技術は、通常の FISH 法の蛍光強度と比較して約8倍程度高く、プローブの細胞浸透性は高感度 FISH 法である catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法に用いるプローブよりも高いことを明らかにしている。

第4章では、rRNA 含有量が少ない環境微生物である海洋中に生息する細菌及び嫌気性グラニュール汚泥及び嫌気性消化汚泥内に生息する古細菌に対して適用した結果について記述している。海洋中に生息している細菌に対して in situ DNA-HCR 法を適用させ、in situ DNA-HCR 法を高感度 FISH 法として適用できることを示している。次に、in situ DNA-HCR 法を嫌気性グラニュール汚泥内及び嫌気性消化汚泥内の古細菌に適用させ、古細菌にも適用できることを明らかにしている。さらに、複数の微生物の多重染色にも成功し、従来の多重染色法よりも容易かつ短時間で染色することに成功している。

第5章では、in situ dual DNA-HCR 法の開発について記述している。開発した技術は、HCR 法を菌体内で2回繰り返す、in situ DNA-HCR 法よりも高感度な蛍光が得られる技術であり、in situ DNA-HCR 法の蛍光強度と比較して約3倍程度高いものであった。

第6章では、トルエンを分解しているバイオリアクター内の微生物群集構造解析及びリアクター内のトルエン分解菌の *tmoA*, *todC* mRNA の視覚的検出を行った結果について記述している。まず、微生物群集構造解析を行い、バイオリアクター内に *tmoA* 遺伝子及び *todC* 遺伝子を有した微生物が存在していること示し、最終的に in situ dual DNA-HCR 法を用いてトルエン分解菌の *tmoA*, *todC* mRNA の視覚的な検出に成功している。

第7章では、本論文で得られた結果と考察を要約し、本手法の位置付け、既報との比較を行い、本手法の有用性を示している。

以上のように本論文は、プローブの細胞浸透性が高い高感度 FISH 法として従来の高感度 FISH 法よりも汎用性が高く、また環境サンプルへの適用性を示している。したがって、本論文のその有効性は高く、工学上および工業上貢献するところが大きい。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

審査委員主査 山口 隆 司 印