

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 工 学 ）	氏名	堀尾 京平
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>Development of mRNA visualization method specific to microbes within consortium (微生物コンソーシアム解析に向けた mRNA 特異的微生物可視化技術の開発)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教 授 岡村 好子</p> <p>審査委員 教 授 秋 庸裕</p> <p>審査委員 教 授 中島田 豊</p> <p>外部審査委員 教 授 小西 正朗 (北見工業大学)</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>本学位論文は、メタトランスクリプトームデータを元に mRNA を細胞内で可視化する技術を開発し、微生物機能や微生物間相互作用の推定に有用であるかどうか検証することを目的としている。学位論文は4章で構成されている。</p> <p>第1章「緒論」で、難培養性細菌の解析手法および、細菌細胞内で mRNA を直接検出する既往の技術の課題と、これを解決する新規技術の開発が本研究の目的であることが述べられている。</p> <p>第2章「微生物細胞内 mRNA 直接検出法 RHa-RCA-FISH 法の開発」において、著者らが開発した RNA 直接検出法 RNase H-assisted rolling circle amplification (RHa-RCA) 法を利用した FISH の開発について報告されている。RHa-RCA は、RNA を直接プライマー化するため、RNA 中の任意の位置を検出標的とすることができ、原理上 DNA を検出しないという利点がある。そこで、ゲノムや細胞質成分が混在する細胞内で mRNA を高感度かつ特異的に検出することを目的とした。グラム陰性菌のモデルには大腸菌を、グラム陽性菌のモデルにはブレヴィバチルスを用いて、プラスミドで標的遺伝子を導入し、発現誘導させた mRNA を標的とした。菌体内で RHa-RCA を行い、RCA 産物を fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) で可視化した。顕微鏡観察の結果、視野中の 80%~90% の細胞内から特異的蛍光が得られ、mRNA を細胞内検出することに成功した。また、プラスミド上の遺伝子 (DNA) からのノイズは発生しなかった。さらに、2 種細菌の混合物での特異的同時検出にも成功した。以上の結果より、既往の mRNA 直接検出技術の課題を解決した新規技術の開発に成功したことが報告されている。以上の内容は、Takahashi H.*, Horio K.*, Kato S., Kobori T., Watanabe K., Aki T., Nakashimada Y., Okamura Y., Direct detection of mRNA expression in microbial cells by fluorescence in situ hybridization using RNase H-assisted rolling circle amplification, Scientific Reports, 10, 9588 (2020). *: equally contributed. において公表されている。</p> <p>第3章「単純菌叢ヨーグルト中の乳酸菌を用いた RHa-RCA-FISH 法の微生物コンソーシアム解析への利用可能性の検証」では、ヨーグルト中の単純菌叢をモデル菌叢として、新規技術が微生物コンソーシアム解析に適用可能であるかを検証した。その結果、可視化された mRNA の発現挙動と、既報の DNA マイクロアレイデータとが良好に一致したことから、</p>			

複合菌叢中の機能遺伝子発現解析に適用可能であることが報告されている。以上の内容は、Horio K., Takahashi H., Kobori T., Watanabe K., Aki T., Nakashimada Y., Okamura Y., Visualization of gene reciprocity among lactic acid bacteria in yogurt by RNase H-assisted rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization, Microorganisms, 9, 1208 (2021). において公表されている。

第4章「結論」において、本研究の意義が総括されている。その中で、本技術はバルク解析で推定した微生物コンソーシアムの個々の微生物の機能を明らかにし、相互作用を個々の微生物単位で検証することを可能にし、これにより、本技術は微生物コンソーシアムでのみ発現する有用機能の分子メカニズムを解明する手法としての利用が期待されると述べられている。また、複合微生物系での利用のみならず、単菌分離培養に向けた重要知見を提供することも述べられている。したがって、微生物コンソーシアムの有用機能のメカニズムの解明や、未知・難培養微生物の利活用の拡充に貢献するなど、新規開発技術の学術的・社会的意義が結論されている。

論文審査委員会では、第2章および第3章がSCI論文に公表されていることを確認し、本論文が学位論文の水準にあると判断した。また、生物工学技術に関する質問他、環境微生物学や微生物生態学における課題解決の可能性、産業利用への規格化の可能性など多岐にわたる質疑があり、これについて実施例や研究構想を述べ、適切に回答していた。研究を主体的に推進する資質についても確認された。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学学位論文評価基準を満たし、著者は博士（工学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。