

(学位第 9 号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨		1006
学位申請者 氏名	OUSSOU-AZO Fifame Auriane (ウスアゾ フィファメ オリアン)	
審査委員	主査 鹿児島大学	准教授 フェスターガード, エム.シ.エム.
	副査 鹿児島大学	准教授 二神 泰基
	副査 佐賀大学	教授 小林 元太
	副査 鹿児島大学	教授 イブラヒム ヒッシヤム
	副査 鹿児島大学	准教授 塩崎 一弘
審査協力者		印
実施年月日	令和 4 年 1 月 25 日	
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)		口答・筆答
<p>主査及び副査は、令和4年1月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>		

1006

学位申請者 氏名	OUSSOU-AZO Fifame Auriane (ウスアゾ フィファメ オリアン)
<p>[質問1] 簡易かつ低コストのバイオセンサーの開発は、特に発展途上国にとって良い技術だと思います。キットの作成に必要な具体的なコストはいくらかかりますか。</p> <p>[回答1] バイオセンサーの最終的な価格はまだ計算していない。現時点での概算では1キットあたり1ドル以下で製造できると考えている。</p> <p>[質問2] バイオセンサーの評価において、DNAの抽出は、炭疽病菌が感染した葉組織ではなく、菌体を使って行われた。葉組織からのDNA抽出は、純粋な菌体からの抽出と異なる可能性がある。同じ方法で抽出することは可能か。</p> <p>[回答2] DNAの抽出は魔法瓶と超音波発生装置を組み合わせて行っている。この方法は、葉組織からのDNA抽出を考慮している。本手法は、乳棒と乳鉢などによる物理的破碎処理よりもDNA抽出効率が優れていることが報告されており、葉組織からのDNA抽出にも使用できると考える。</p> <p>[質問3] リポソームと銅ナノ粒子の相互作用の結果は、興味深い。脂質膜は生物に共通しているため、銅ナノ粒子は植物炭疽病菌だけでなく、多くの微生物と相互作用できるのではないか。銅ナノ粒子は炭疽菌以外の生物の細胞にも影響を与えるのか。</p> <p>[回答3] 銅は植物病害の予防に使用されており、多くの病原菌に対して防除効果があることが報告されている。しかし、銅の濃度や種類、とくに銅ナノ粒子のもつ効果については十分に解析されていない。炭疽菌以外の微生物に銅ナノ粒子が及ぼす効果については、今後調べる必要がある。</p> <p>[質問4] 迅速で使いやすい検出方法の開発が目的だが、全工程で約1.5時間かかる。これは迅速と言えるのか。LAMPによるDNAの増幅の工程に1時間程度のインキュベーションがある。これをどう考えるか。</p> <p>[回答4] 指摘のとおり、今のところ全工程で1時間30分ほどかかる。しかしLAMPはまだ最適化されていないため、各試薬の濃度、プライマーの選択、温度条件などの検討の余地がある。例えば、反応温度には65℃を設定してい</p>	

るが、もっと低い温度でも可能である可能性がある。LAMPによる標的DNAの増幅には1時間かかっている。先行研究では、30分での増幅に成功した例があり、LAMPの最適化により時間を短縮できる可能性がある。なお、現在の実験操作はすべて実験室で実施したため、現場でのテストを実施する必要があると考えている。

[質問5] 走査型電子顕微鏡による観察結果に、銅ナノ粒子の位置を示す矢印がある。どうして銅ナノ粒子だと言えるのか。

[回答5] 炭疽病菌を銅ナノ粒子で処理しなかったコントロールにおいて確認することができない点状の構造体であるため、銅ナノ粒子であると考えている。なお、この構造体は銅ナノ粒子が凝集しているものと考えている。

[質問6] (この図のデータは) リポソームと銅ナノ粒子の相互作用を表しているか。

[回答6] 相互作用ではなく、銅ナノ粒子の局在を示している。この結果から、銅ナノ粒子が小胞の中に入っていないと考えられる。また、エキソサイトーシスが観察された。なおマイクロメートルのスケールで観察できないサイズの銅ナノ粒子が存在し、それらが膜を透過してリポソーム内に入る可能性はある。

[質問7] なぜこのバイオセンサーが必要なのか。サンプルを採取して研究所に持ち込めば従来の方法で検出できる。

[回答7] 日本やいくつかの先進国、そして発展途上国でも、農園や商業化された農業現場で研究室を保有しているところはほとんどない。すなわち、研究所にサンプルを持ち込んで検査するには時間を要する。作物の病害の発見と対策は早期に行うことが重要である。そのためにバイオセンサーが必要である。

[質問8] DNA抽出から検出までの工程は、現場では実際にどのように行われるのか。

[回答8] まず、病原菌に感染した葉と細胞溶解を促すバッファを混合し、携帯可能な超音波発生装置で30秒処理する。その後、サンプルを魔法瓶で10

1006

分間インキュベートし、サンプルに紙片（4 × 10 mm）を浸す。この紙片はDNAを吸着する性質がある。紙片を取り出して洗浄バッファーに素早く浸し、さらにLAMPのマスターミックスに移して標的のDNAを増幅する。なお、LAMPの反応は、同じ魔法瓶でインキュベートして行う。その後、LAMPの反応液に検出ストリップを浸し、標的病原体の有無を検出する。実物をここに示す（ここで検出ストリップの実物を提示）。現場での使用には、これ以上の最適化は必要ないと考える。

[質問9] 銅ナノ粒子による炭疽病菌のコロニー形成の抑制と細胞の生存率の抑制効果を調べた理由とその違いは何か。

[回答9] 菌糸伸長はコロニー形成を観察して肉眼レベルで観察できる。アラマーブルーテストによる細胞の生存率のデータは、肉眼では見れない孢子等も対象に含まれる。この方法では、生成される色に基づき24時間で生存率を評価できる。しかし、48時間まで反応時間を延ばした際に、酸化銅ナノ粒子と銅ナノ粒子とで抑制効果が異なることが示唆された。

[質問10] 銅ナノ粒子と細胞膜との相互作用が殺菌性に関与しているのか。細胞膜は細胞壁に囲まれているが、銅ナノ粒子は細胞壁を通過して細胞膜にアクセスできるか。

[回答10] 実験に用いたモデル膜には細胞壁がないため、本実験では細胞壁を通過することは確認できない。フーリエ変換赤外分光分析の結果に基づけば、銅ナノ粒子は細胞壁に含まれるキチンやタンパク質に変化をもたらした可能性もある。