

マイクロ現場型遺伝子解析システムの実海域展開と機能の高度化  
Deep-sea Deployment of a Microfabricated *In Situ* Gene  
Analysis System and Its Functional Sophistication

藤井 輝夫 (Fuji Teruo)

東京大学・生産技術研究所・教授



研究の概要

深海などの極限的な環境下において、主にそこに生息する微生物を対象とした遺伝子解析を行うことのできる現場型の遺伝子解析装置を実現する。装置の開発にあたっては、マイクロ流体デバイスを積極的に応用することで、装置の高度な小型・集積化及び機能の高度化を目指す。

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学／船舶海洋工学

キーワード：海洋探査・機器

1. 研究開始当初の背景・動機

研究代表者らのグループでは、深海の熱水地帯等に生息する微生物の遺伝子解析を現場で行うことのできる装置の実現を目指して、研究開始当初までに実験室環境において評価を行うことのできるプロトタイプシステムの構築に至った。その結果、深海環境を模擬した環境下において実験室レベルでの性能評価を行う段階に達した。しかし、実際の現場環境で装置システムを稼働させ、その評価を行うためには、さらなる機能の集積化と高度化が必要である。

2. 研究の目的

本研究では実用レベルの現場型遺伝子解析システムを完成させた上で、実際に深海無人探査機や定点設置型サンプル処理装置などに搭載し、実海域における現場計測を試みる。また、特にサンプルの前処理機能について改良を加えることで、マイクロ現場遺伝子解析システムの機能を高度化することを目的とする。また、米国モンタレー湾水族館研究所 (MBARI) において開発が行われている「Environmental Sample Processor (ESP)」に搭載し、海洋の現場において長期間の装置運用を目指す。

3. 研究の方法

現場型遺伝子解析システムの開発には、スパッタ装置、蒸着装置、ドライエッチング装置等を用いて、研究代表者及び共同研究者らがこれに従事している。製作した装置の評価を行うため、リアルタイム PCR

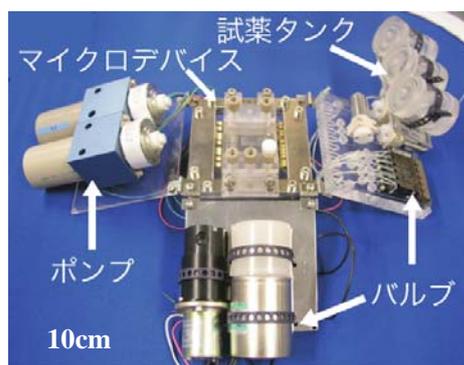
装置及び、紫外可視分光光度計、高感度光電子増倍管を備品として購入した。また、本研究を円滑に遂行するため、常時 1 名のポスドクを雇用している。装置の実海域展開については主に (独) 海洋研究開発機構所有の ROV を利用している。

4. これまでの成果

<平成 17 年度>

平成 17 年度は、マイクロ現場遺伝子解析システム (IISA-Gene: Integrated *In Situ* Analyzer - Gene) の機能の高度化に向けて、環境中の微生物細胞から DNA を精製する方法やデバイス内部を洗浄するためのバッファ、それを用いた処理法についての基礎的な評価試験を行った。その結果、主にカオトロピック試薬及びガラスビーズを用いて DNA を精製する方法、及び次亜塩素酸ナトリウム水溶液によるデバイス洗浄がそれぞれ有効であることを確認した。その成果を基に深海等の環境下で使用可能な装置のプロトタイプを完成させた。また、製作した IISA-Gene について深海環境での動作試験を行うため、海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の調査船および無人探査機を用いた調査航海を平成 17 年度 5 月に実施し (NT05-04)、南西諸島・石垣島沖海底の熱水噴出地帯 (鳩間海丘・水深約 1400m) にシステムを投入した。真性細菌特異的な遺伝子 (16S rDNA) の試験的な現場解析の結果、目標としたほど明瞭な増幅シグナルを得ることはできなかったが、現場海水の導入から目的とした遺伝子断片の PCR による増

幅・光学検出まで、一連の動作が可能であることが確認することができた。



#### <平成 18 年度>

平成 18 年度は、前年度に製作した改良型の IISA-Gene について、実際に現場で運用するための装置構成を検討し、製作した(図 1)。その結果、加圧状況下における装置の安定性が向上し、運用性についても飛躍的に向上した。また、IISA-Gene の PCR 部を用いて、メタン酸化細菌が特異的に有する機能酵素遺伝子 (particulate methane monooxygenase; *pMMO*) の検出を試みた結果、卓上型の PCR サーマルサイクラと同程度の感度を示した。さらに、マイクロデバイスを用いた場合、PCR に要する時間は約 20 分と非常に高速・高感度な解析が可能であることが明らかになった。また、カオトロピック試薬及びガラスビーズを用いた DNA 精製を行うための前処理デバイスについて、IISA-Gene 用マイクロデバイスへの集積化を行い、主に大腸菌細胞及びゲノム DNA をサンプルとして、DNA の精製から PCR といった遺伝子解析に必要な一連の操作が可能であることを確認した。

#### <平成 19 年度>

平成 19 年度は遺伝子検出感度の向上を目的として、主に IISA-Gene の DNA 精製を行う部分について、性能評価と DNA 回収率の向上について検討を行った。その結果、DNA 回収率はガラスビーズからの DNA 溶出率に依存していることが示唆された。そこで溶出温度を 95°C まで高くすることによって DNA の回収率を向上できた。評価の結果、投入した DNA の約 30% を回収可能であることが明らかとなった。ガラスビーズの洗浄については、非加熱の状態で PCR に用いるバッファでの洗浄が可能であることが分かった。これにより PCR 阻害の無い溶液による洗浄法が確立できた。

また、特に *pMMO* 遺伝子を標的とした場合に PCR 結果の再現性が低いことが分かった。そこで、その原因、解決法に関する検討を行った。その結果、マイクロデバイスに用いられている様々な材料から PCR 阻害物質が溶

出していることが示唆された。これについては、PCR プライマーを変更することで解決することができた。IISA-ATP についてはマイクロ流路構造について最適化を行った結果、2pM までの ATP を検出・定量することが可能になった。

#### 5. これまでの進捗状況と今後の計画

「IISA-Gene」の製作については、そのプロトタイプまでの製作を予定通り行うことができた。その後、そのプロトタイプを基に現場で使用することが可能な仕様にまで改良を行うこともできた。検出感度に関しては、DNA 抽出の前の前処理課程に関する詳細な条件検討を行い、感度を向上することができた。

平成 20 年度以降は主に、IISA-Gene の最終的な調整及び運用を行い、データの取得を行う。また、ESP への組み込みについて具体的な実施に向けて、MBARI の研究者らと詳細な仕様のすり合わせとスケジュールについて決定する。

#### 6. これまでの発表論文等

- 1) 「ガス漏洩モニタリング (間接検出法: バイオマーカー利用モニタリング) — 遺伝子マーカーによるメタン漏洩の原位置検出技術の開発 —」 帆秋利洋, 沖田紀子, 布施博之, 福場辰洋, 藤井輝夫, 鋤崎俊二, 天石文, 片山美津瑠, 吉田光毅, 安田博和, 藤原靖, 月刊海洋, vol.40, 106-116. (2008)
- 2) “Development of Integrated *in situ* Analyzers (IISA) for Oceanography Applications” T. Fukuba, A. Miyaji, N. Fukuzawa, C. Provin, T. Yamamoto, L. Glutz, T. Okamoto, T. Fujii, Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2007) (Paris, France 2007.10) Proceedings pp. 844-846, (2007)
- 3) 「現場型遺伝子解析装置 “IISA-Gene” の開発」 福場辰洋, 宮地輝光, 山本貴富喜, 藤井輝夫, 月刊海洋, vol. 38, 871-876, (2006)
- 4) “Development of an Integrated *In Situ* Analyzer for Quantitative Analysis of Microbial ATP in Aquatic Environments” T. Fukuba, N. Fukuzawa, L. S. Glutz, A. Miyaji, T. Fujii, Proceedings of International Symposium on Underwater Technology 2007, 240-244, (2007)
- 5) 「マイクロ流体デバイスを用いた集積化現場計測 “IISA” の開発」 福場辰洋, 宮地輝光, C. Provin, 福沢範行, 藤井輝夫, 日本船舶海洋工学会講演会論文集 第 3 号, 31-34, (2006)

ホームページ等

<http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp>