

研究課題名（和文）	マイクロ流体デバイスによる新たな遺伝子抽出技術を用いたシーケンス用サンプル調整ボトルネックの解決
研究課題名（英文）	Alleviating the “Sample to Sequence” Bottleneck Using Novel Microfluidic Lab-on-a-Chip Nucleic Acid Extraction Technologies
日本側研究代表者氏名	福場 辰洋
所属・役職	国立研究開発法人海洋研究開発機構 海洋工学センター 技術研究員
研究期間	平成30年 4月 1日～令和3年 3月31日

### 1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
福場 辰洋	海洋研究開発機構・技術研究員	マイクロ流体デバイスの評価、遺伝子抽出装置プロトタイプ的设计・製作
藤井 輝夫	東京大学生産技術研究所・教授	マイクロ流体デバイスの設計・製作

### 2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

マイクロ流体デバイスを用いた遺伝子抽出装置について、英国側から必要なサンプルおよびプロトコルの評価結果の提供を受け、日本側でも標準サンプルを準備した上で設計を開始、年度内に概略設計と試作装置の製作を完了させる。同時に、試薬を用いた細胞溶解・精製法について再評価を行い、情報を英国側と共有する。また、現場型遺伝子解析装置（IISA-Gene）及び海洋遺伝子アーカイバ（MGA）の整備と、遺伝子抽出装置と組み合わせた評価に必要な改良を開始する。

### 3. 日本側研究チームの実施概要

研究初年度は、まずグラム陰性・陽性・酵母が混合された市販の微生物標準サンプルを用いて遺伝子抽出プロトコル及び装置の評価が可能な環境を構築した。具体的には 16SrRNA ユニバーサル遺伝子等を標的とした定量 PCR、蛍光試薬を用いた高感度な DNA 定量、及び不純物の定量も可能な吸光度測定による DNA 定量などが可能な体制を構築した。また、試作されたマイクロ流体デバイスについて、送液、加熱などの基礎的な実験が可能な環境を整備した。

まず、試験管を用いてグアニジンチオシアネート（GuSCN）をベースとした溶解試薬とガラスビーズを用いる Boom 法を用いて、DNA 精製の効率等を評価した。その結果、現在使用している直径約 100 $\mu$ m のガラスビーズにおいて、ガラスビーズ 1mg あたり DNA 吸着量を見積もることができた。海水サンプルに含まれる微生物 DNA の量は沿岸域で数 $\mu$ g/L 程度であることから、1L の環境海水を処理する為に必要なガラスビーズの量を算定できた。

試験管を用いた評価の結果、投入された DNA のほとんどがガラスビーズに吸着された一方で、回収率は低かった。DNA の回収効率を高めるには、洗浄工程における溶出を最小化し、溶出工程における溶出の最大化が求められる。これらについては、洗浄バッファの組成及び溶出温度の最適化を進めており、研究 2 年度目の前半において最適化される。

以上の基礎検討結果を基に、十分量の以上のガラスビーズを保持できるチャンバを持つマイクロ流体デバイスを試作した。このデバイスは、5cm $\times$ 7.5cm のガラス基板上に 5 つのサンプルを処理できるシリコンゴム(PDMS)製の流路が並列配置されたものである。このデバイスを用いて DNA の吸着・回収効率を見積もるための評価を行ったところ、マイクロデバイスに DNA 溶液を供給する際の流速が DNA 吸着効率に影響していることが示唆された。そこで、処理量を低下させないで流速を下げるためにガラスビーズ保持部の幅を広く改良し、12 サンプルが並列処理可能な 5 インチ直径のマイクロ流体デバイスを設計、製作した。

Boom 法と市販キットを用いた物理的破碎法による DNA 抽出結果の違いを検証するため、市販の菌体混合物および天然海水をサンプルとして使用し、16SrRNA 遺伝子を対象としたメタゲノム解析を行うことで、多様性解析の結果を比較した。その結果、手法間で大きな違いはなく、抽出方法の違いによるバイアスは最小限であることがわかった。

現場型遺伝子解析装置（IISA-Gene）及び海洋遺伝子アーカイバ（MGA）については、研究 2 年度目における評価試験を見据えて整備に着手した。