

日本—英国 国際共同研究「マリンセンサー」 2019年度 年次報告書	
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	2018年 4月 1日 ～ 2021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设计・製作

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

初年度の評価結果に基づいて、グアニジンチオシアネート（GuSCN）を用いた溶解・精製法を実施可能なマイクロ流体デバイスを設計・製作し、送液系等と組み合わせて評価する。また、NOCにおいて検討が進められている酵素を用いた抽出法についても、マイクロ流体デバイスを試作する。それらのデバイスについて、開発済みの遺伝子解析装置、サンプル採取装置などと組み合わせた動作を可能にする。抽出されたDNAについて、メタゲノム解析を実施することで、クオリティコントロールを実施する。

3. 日本側研究チームの実施概要

遺伝子抽出の中核となるマイクロ流体デバイスについては、3D プリンタを用いることで、市販のフィルターユニット（ステリベクス）とほぼ同サイズの遺伝子抽出カラムを設計・製作できた。細径の円筒形カラム内に DNA 吸着材を保持できる構成で、文部科学省・環境情報把握技術開発プログラムにおいて開発が進められている自動サンプル採取装置で使用されている送液系に取り付けることで DNA 精製用の送液系として使用することができる。DNA 回収効率を向上するための加熱機構については、12 チャンネルの送液・温度制御基板の製作と基礎評価までを完了した。

遺伝子抽出装置の総合評価とクオリティコントロールについては、天然海水を対象とした手作業による抽出操作（GuSCN および市販キット）と GuSCN と新たな DNA 抽出カラムを用いた手法による遺伝子抽出の結果について、自動化による解析結果バイアスの有無を確認した。当初計画では 0.22 μm 孔径のフィルタを用いた原核生物の遺伝子解析を計画していたが、進行中の他の研究課題との連携を考慮し、0.45 μm フィルタ濾過サンプルを用いた魚類メタゲノム解析によって比較検討を行った。

サンプルは海洋研究開発機構、横須賀本部岸壁から採取した海水を用い、1)メンブレンフィルタ濾過後、試験管+DNA 吸着材を用いた抽出、2)ステリベクス内での GuSCN 溶解から試験管+DNA 吸着材を用いた抽出、3)メンブレンフィルタ濾過後、市販のビーズを用いた抽出キットを用いた抽出、4)メンブレンフィルタ濾過後、マイクロ流体デバイスを用いた抽出をそれぞれ実施して、魚類メタゲノム解析（MiFish）を行った。

その結果、得られた DNA の量は 3)の市販キットが最も高かったため、GuSCN 法による DNA の回収効率に引き続き課題があることが分かった。一方で、PCR 増幅～メタゲノム解析を実施した結果、得られた結果に決定的な差や明確な傾向は見られなかった。どのサンプルでもコノシロ類が多く検出される傾向にあった。市販キットおよび試験管を用いた抽出ではフグ類の検出も目立ったが、マイクロデバイスではフグ類は検出されなかった。以上の様に、処理法による解析結果の違いも見られたが、メタゲノム解析に先立つ PCR 増幅によるバイアスの影響も考えられることから、今後解析サンプル数を増やすなどして詳細に比較を行うことが重要である。また、DNA 回収率が低いことは低出現頻度の魚類の検出を困難にする可能性があることから、回収率の向上についても引き続き検討を行う必要があることが分かった。

また、精製された DNA の長期保存がメタゲノム解析の結果に及ぼす影響を見積もるため、上記試験に使用した DNA の冷凍保存を開始した。

以上