

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17106012

研究課題名（和文） マイクロ現場遺伝子解析システムの実海域展開と機能の高度化

研究課題名（英文） Deep-sea deployment of a Microfabricated In Situ Gene Analysis System and Its Functional Sophistication

研究代表者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：30251474

研究成果の概要（和文）：

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、実際に深海も含めた海洋の現場において、真性細菌に代表される微生物の遺伝子を検出できる装置を運用することに成功した。また、マイクロ流体デバイスを応用することでサンプル前処理機能の集積化や活性測定機能も実現した。同時に米国モンタレー湾水族館研究所（MBARI）との共同研究についても進展させ、その結果赤潮藻類の現場検出に向けた基礎的な評価試験を実施することができた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed an *in situ* gene analysis system that can be applied to oceanography. The system was successfully deployed in deep-sea environments to analyze microbial communities. By utilizing microfluidic devices, sample pre-treatment function was integrated. In situ microbial activity assay method was also established in this study. Corroborative work was carried out with Monterey Bay Aquarium Research Institute (MBARI) and it resulted in a successful evaluation of the system for red-tide plankton monitoring.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2006 年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2007 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2008 年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2009 年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
総計	70,200,000	21,060,000	91,260,000

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：マイクロ流体デバイス 現場分析装置 遺伝子解析 深海 PCR DNA 精製微生物 ATP

1. 研究開始当初の背景

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た。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等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ポスドクを雇用した。

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無人探査機 (ROV) を利用して実施した。

4. 研究成果

(1) まず 2005 年度には、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洗浄パufferやそれを用いた処理法についての検討及び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有効であることを確認した。その成果を基に、実際に深海等の極限環境下で使用可能な装置のプロトタイプシステムを完成させた。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「なつしま」および無人探査機「ハイパードルフィン」を用いた調査航海を 2005 年 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) に実際にシステムを投入した。真性細菌特異的な遺伝子 (16S rDNA 遺伝子) の試験的な現場解析の結果、目標とした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。

(2) 続いて 2006 年度は、前年度に製作した改良型の IISA-Gene について、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、運用性を飛躍的に向上した。

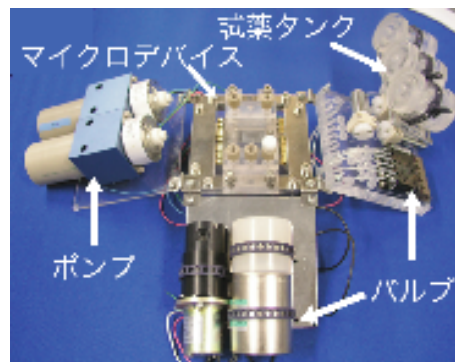


図 1 IISA-Gene 改良型

また、IISA-Gene の PCR 部を用いて、メタン酸化細菌等の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。

さらに、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。

(3) 2007 年度は、前年度までに完成させた IISA-Gene プロトタイプをもとに、実海域投入可能な前処理機能付きの現場遺伝子解析システムを製作し、性能の評価及び安定性の向上に取り組んだ。評価には 2008 年 1 月に実施された研究航海 (NT08-03) で採取したサンプルを使用した。

また、前年度までにおいて開発・評価を行った IISA-ATP に関しても、実海域投入が可能なシステムのプロトタイプを構築し、実験室環境においてその評価を行い、十分に実海域で用いることができる感度を達成した。また、IISA-Gene との機能的な集積化についての机上検討を実施した。

米国モンタレー湾水族館研究所 (MBARI) との共同研究については、2009 年度からの本格実施に向けた基礎実験に関する検討と打ち合わせを行った。

〔4. これまでの成果（続き）〕

(4) 2008 年度は、これまでに製作した装置を 2008 年 6 月に実施された研究航海(NT08-11)において南西諸島沖・鳩間海丘海域にて運用し、水深約 1500m の熱水噴出孔近傍にて真性細菌特異的 16S rRNA およびメタン酸化酵素(pMMO)遺伝子の検出を試みた(図 2)。その結果、pMMO については検出限界以下であったが、16S rRNA 遺伝子については陽性反応を得ることが出来た。以上の結果により、これまで本研究課題において開発に取り組んできた現場型遺伝子解析装置の基本的な性能が実証され、世界初の深海現場遺伝子解析を実現することができた(図 3)。

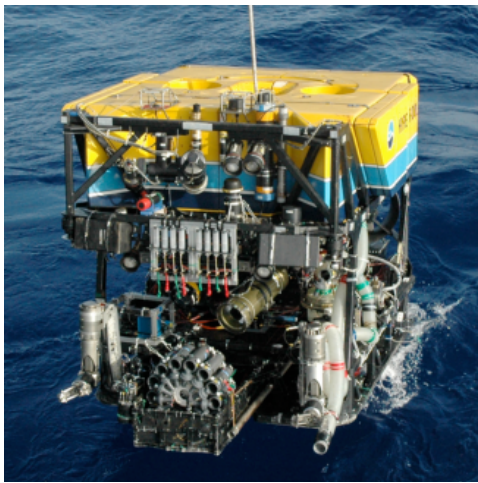


図 2 IISA-Gene を搭載した ROV

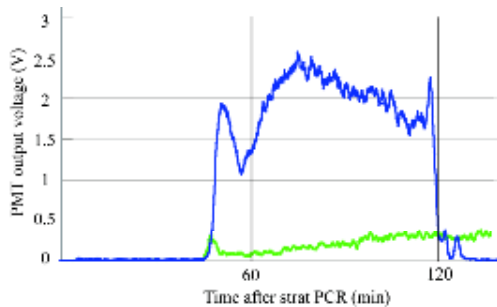


図 3 IISA-Gene で得られた現場遺伝子解析の結果(青: 16S rRNA 遺伝子、緑: pMMO 遺伝子)

加えて、現場運用試験の結果を解析すると共に、さらなる機能高度化の為の課題抽出に取り組んだ。その結果、現場において得られた陽性反応は非特異的増幅による擬陽性ではないことが明らかとなった。また、本装置を現場で運用する際の信頼性を確保するためにサンプル回収機構の再検討が必要であることを明らかにした。また、2008 年 12 月実施の研究航海(NT08-24: 相模湾初島沖)に参加し、今後のメタン酸化酵素(pMMO)遺伝子の高感度検出に向けた評価試験に必要

な海水・底泥サンプルを採取した。これまでに得られたサンプルの解析の結果、pMMO 遺伝子をはじめ、多くのバイオマーカー遺伝子が底泥中に多く存在することが明らかとなった。このことから、底泥間隙水中からの分析サンプル採取機構の必要性が明らかとなった。さらに、IISA-Gene の機能高度化に向けて、遺伝子の検出に加えて定量機能の付加について検討を行い、基礎的な評価を実施した。その結果、マイクロヒータの ON/OFF といった非常に簡便な方法によって DNA 特異的蛍光色素を用いた定量 PCR が可能であることが示された。

また、ATP 定量に基づく微生物活性現場分析装置の開発を実施し、NT08-24 航海及び平成 2009 年 3 月実施の石垣島・竹富島海底温泉海域調査において同装置の性能を評価した。その結果、深海及び浅海の現場においてそれぞれ微生物の活性を現場計測できることが明らかとなった。

米国モンタレー湾水族館研究所(MBARI)の現場型サンプル処理装置(ESP)との機能集積化に向けて、標的とする赤潮藻類(*H. akashiwo*)の培養体制を確立し、また定量 PCR 法による *H. akashiwo* 特異遺伝子の検出に関する評価に着手した。

(5) 本研究の最終年度となった 2009 年度には、これまでに基本的な製作と評価を実施した前処理機能付きマイクロ現場遺伝子解析システム(IISA-Gene)について、さらにその安定性及び感度を向上するための改良を行った。具体的には、試薬導入法の改良や流体マニホールドの設計変更、及び装置全体の運用性向上に関わる改良を行った。また、2009 年 9 月から 10 月にかけて(NT09-17)及び 2010 年 3 月(NT10-05)航海において、海洋調査船「なつしま」及び無人探査機「ハイパードルフィン」による深海での計測実験をそれぞれ南西諸島沖、鹿児島湾内にて実施した。その結果、深海環境における動作を確認し、また PCR 産物の回収にも初めて成功した(図 4)。

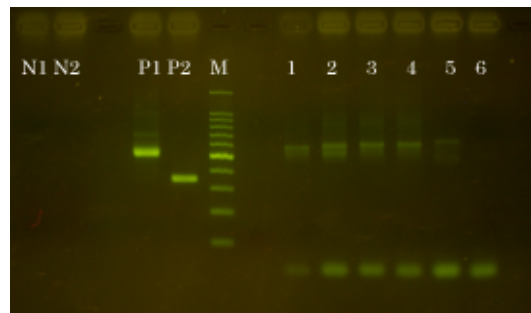


図 4 回収された PCR 産物の電気泳動結果
レーン 1~6: 回収された産物
その他 : コントロール実験の結果

[4. これまでの成果 (続き)]

また、遺伝子の検出だけでなく、定量分析を行うための機能要素について検討し、評価試験を実施した。その結果、高感度の光電子増倍管(PMT)を用いる事で、TaqMan PCR法に代表される定量PCR法を用いた微生物の遺伝子定量が可能であることを明らかにした。同時に遺伝子解析の信頼性を向上させるためにより純度の高いマイクロ流体デバイス材料の使用について評価・検討を行った。

微生物ATP定量分析装置(IISA-ATP)について、主に得られるデータの信頼性向上に向けた改良を行った。また、分析に用いる試薬の混合による沈殿物の発生とその対策法について検討した。

米国MBARIにて開発中のESPとIISAシリーズ装置については、その機能集積化に向けた具体的な検討・技術的な打ち合わせを行った。赤潮藻類遺伝子の検出については、それに必要となるプライマー配列などの情報提供を受け、評価試験を行った結果、IISA-Geneを用いて検出可能であることが明らかとなった。また、実際の集積化及び実海域運用についてスケジュール調整を試みたが、本年度中の実施が困難であった。そこで今後も協力体制を維持し、可能な限り早期に計画を実現することで合意した。

(6) 以上、5年間の研究によって、マイクロ流体デバイスを用いた現場型微生物遺伝子解析装置の実用的な運用と、さらなる機能の高度化を世界に先駆けて達成し、また実際の現場においてその性能を詳細に評価することができた。また、海外研究期間との共同研究についても今後の継続的な展開が期待することがきる。本研究によって得た基礎・応用に渡る広範な技術要素は、深海環境探査のみでなく、赤潮藻類などの社会問題を対象とした浅海・沿岸環境のモニタリングへの応用も期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Y. Aoki, T. Fukuba, T. Yamamoto, T. Fujii, “Design Optimization and Evaluation of a Bioluminescence Detection Part on a Microfluidic Device for in situ ATP Quantification” IEEJ Trans. SM, 129, pp. 73-76, 2009 査読有り
- ② 帆秋利洋、福場辰洋、藤井輝夫、布施博之、「海底表層でのバイオマーカーを利用したメタン漏洩検出技術の開発」海洋と生物、177, pp. 505-515, 2008 査読無し

- ③ 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、「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 —」月刊海洋, 40, pp. 106-116, 2008 査読無し
- ④ 福場辰洋、宮地輝光、山本貴富喜、藤井輝夫、「現場型遺伝子解析装置”IISA-Gene”の開発」月刊海洋, 38, pp. 871-876, 2006 査読無し
- ⑤ 藤井輝夫、「海洋における現場計測分析技術の新展開—総説—」月刊海洋38, pp. 825-830, 2006 査読無し
- ⑥ 福場辰洋、山本貴富喜、長沼毅、藤井輝夫、「極限環境微生物学のための現場型微生物遺伝子解析装置の開発」海の研究、14, pp. 361-368, 2005 査読有り

[学会発表] (計34件)

- ① T. Fukuba, Y Aoki, T. Fujii “Microbial Activity Assay in Deep-Sea Environment using a Microfluidic Device” μTAS2009, (Jeju, Korea 2009. 11. 5), Proceedings pp. 2010-2012 査読有り
- ② T. Fukuba, M. Hiraga, A. Takamatsu, T. Fujii, “PCR Based DNA Detection in Deep-Sea Environment” μTAS2009 (Jeju, Korea 2009. 11. 3), Proceedings pp. 1279-1281 査読有り
- ③ T. Fukuba, C. Provin, Y. Aoki, K. Okamura, K. Shitashima, T. Yamamoto, T. Fujii, “Development of Integrated *In Situ* Analyzers and its Application to Oceanography” PITTCO2009, (Chicago, USA, 2009. 5. 8-13) Abstract p. 2690-9P
- ④ T. Fukuba and T. Fujii, “Microfluidic *in situ* Biological and Chemical Sensing”, 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM), (Shizuoka, Japan, 2008. 11.20) Proceedings p. 182
- ⑤ T. Fukuba, M. Hiraga, A. Takamatsu, C. Provin, T. Yamamoto, T. Fujii, “Simple Method for Quantitative PCR Using Flow-Through PCR Device” μTAS 2008, (San Diego, USA, 2008. 10. 16), Proceedings pp. 1743-1745
- ⑥ 平賀雅隆、福場辰洋、山本貴富喜、高松敦子、藤井輝夫、「Flow-through PCR装置によるDNAの定量」第17回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (17th CHEMINAS)、(福岡 2008. 5.20-21) 要旨

- 集 p.57
- ⑦ Y. Aoki, T. Fukuba, T. Yamamoto, T. Fujii, “Development of “IISA-ATP” System for in situ Microbial Activity Assessment in Deep-sea Environment” OCEANS’08 MTS / IEEE KOBE-TECHNO-OCEAN’08 (Kobe, Japan, 2008. 4)
- ⑧ T. Fukuba, A. Miyaji, N. Fukuzawa, C. Provin, T. Yamamoto, L. Glutz, T. Okamoto, T. Fujii, “Development of Integrated *in situ* Analyzers (IISA) for Oceanography Applications” μ TAS 2007 (Paris, France, 2007. 10. 9) Proceedings pp. 844-846
- ⑨ 青木優介、福場辰洋、山本富貴喜、藤井輝夫、「現場型ATP定量装置IISA-ATPの開発とマイクロ流路形状の検討」、第25回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、(東京, 2007. 9. 15)、要旨集 p. 103
- ⑩ T. Fujii and T. Fukuba, “Microfluidic-Based *in situ* Biological and Chemical Sensing –Towards Integrated and Real-Time Measurements in Deep-sea–“ International Symposium on Underwater Technology 2007 (Tokyo, Japan, 2007. 4. 19), Proceedings p 210
- ⑪ T. Fukuba, N. Fukuzawa, L. S. Glutz, A. Miyaji, T. Fujii, “Development of an Integrated *In Situ* Analyzer for Quantitative Analysis of Microbial ATP in Aquatic Environments” International Symposium on Underwater Technology 2007 (Tokyo, Japan, 2007. 4. 19), Proceedings pp. 240-244
- ⑫ T. Fukuba, T. Fujii “Development and Evaluation of the Integrated *In Situ* Analyzer for Gene- “IISA-Gene” for Microbiology in Extreme Environments” 2006 International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (Okinawa, Japan, 2006.5.9-12), Proceedings pp. 184-187
- ⑬ N. Fukuzawa, T. Fukuba, T. Fujii, “Development of *in situ* ATP Quantitative Analysis System “IISA-ATP”” 2006 International Conference on Micro technologies in Medicine and Biology (Okinawa, Japan, 2006.5.9-12), Proceedings pp. 260-263
- ⑭ 福場辰洋、岡本拓士、長沼毅、金子亮、林徹、許正憲、吉田尊雄、岡村慶、下島公紀、前田義明、小池祐一、藤井輝夫、「深海熱水地帯における化学及び生物活動に関する現場複合計測の試み」2005年度日本地球化学会第52回年会講演会 (沖縄, 2005. 9.26)、要旨集 p 7
- ⑮ T. Fukuba, A. Imhof, M. Matsunaga, N. Takagi, T. Yamamoto, K. Okamura, T.

Naganuma, T. Fujii, “Development of miniaturized *in situ* analysis devices for biological and chemical oceanography” Microtechnology in Medicine and Biology, 2005. 3rd IEEE/EMBS Special Topic Conference (Hawaii, USA ,2005. 5.12-15), Proceedings p56- 59.

- ⑯ T. Fujii, “Processing and Analyzing Biological Samples in Microchannels” 3rd International Conference on Micro channels and Minichannels (ICMM 2005.6.13-15), Proceedings p. 75083

[図書] (計 1 件)

- ① 福場辰洋、藤井輝夫、「マイクロ流体デバイスの深海微生物探査への応用」、シーエムシー出版、松永是、竹山春子監修「バイオテクノロジーシリーズ マリンメタゲノムの有効利用」2009、pp. 14-27

[その他]

ホームページ等

http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)
 東京大学・生産技術研究所・教授
 研究者番号：30251474

(2)研究分担者

山本 貴富喜 (YAMAMOTO TAKATOKI)
 東京大学・生産技術研究所・助教
 (H17→H19)
 研究者番号：20322688

福場 辰洋 (FUKUBA TATSUHIRO)
 東京大学・生産技術研究所・特任准教授
 (H17→H19)
 研究者番号：80401272