

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03524

研究課題名（和文）振動を用いた37 秒速DNA増幅装置の開発

研究課題名（英文）Development of vibration-driven DNA amplification system performing at a speed per second and a temperature of 37 degrees

研究代表者

山口 栄雄（Yamaguchi, Shigeo）

神奈川大学・工学部・教授

研究者番号：20343634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、熱の代替として振動を用いた新たなDNAの増幅法を目標とした基礎的実験を実施した。本実験では、DNAや試薬を含んだ溶液の温度は37 一定とし、試薬の入ったチューブごと可聴周波数で振動させることを特長とする。この手法により、DNAを変性および増幅をさせるために必要な注入エネルギーを精密にコントロールすることが可能となり、温度を高温に変化させることがなく、DNAや酵素等にダメージをいれずに増幅することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

振動によりDNAへの精密なエネルギー注入が可能であるため、DNA増幅を高速かつ37 恒温下で実施可能な新技術を確立するための端緒となり得るだろう。増幅進行温度は、37 という生細胞が生存し得る温度での恒温条件で実施し、これにより、DNAや酵素の損傷を防ぐことが可能となり、さらに、増幅完了までに要する時間が大幅に短縮することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have been targeting the achievement of novel DNA amplification using a vibration mechanism. The specimen in a plastic tube was set at a temperature of 37 and vibrated at audible frequency; precise control of DNA denaturation and amplification is possible and DNA is expected to be amplified with little damage in it.

研究分野：半導体応用

キーワード：核酸 振動 高速

1. 研究開始当初の背景

生体医工学や分子生物学の分野では、DNA 分析を用いた手法が不可欠であり、バイオテクノロジーの発展につれ、高精度かつ高速の DNA 増幅法が所望されている。一般に、DNA を増幅させるための、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法では、通常、94 : 熱変性、54 : アニール、72 : 伸長の 3 種の温度間で熱サイクルを実施するが、94 という高温加熱を必須とすることで引き起こされる問題点が内在する。たとえば、高温下で多数回の熱サイクルにより DNA の損傷や酵素の失活が生じ、熱サイクルも、理想的な矩形波ではなく、裾を引き、実際にはかなり歪んだ形状になっている。その結果、本来のターゲット以外に余分な増幅部分 (非特異性) や断片由来のスミアが生じることで、DNA 解析の結果に不正確さが引き起こされ得る。そこで、本研究では、100 ~ 500Hz の可聴周波数帯の振動数で DNA 水溶液チューブを振動させ、37 恒温下で DNA の変性を実現し、PCR に応用した増幅を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 水溶液の入ったプラスチックチューブ全体を 100 ~ 500Hz の可聴周波数で振動させることにより、DNA 増幅を短時間かつ 37 恒温下で実施可能な新技術を開発することを目的とした。増幅進行温度は、37 という生細胞が生存し得る温度での恒温条件で実施し、これにより、DNA や酵素の損傷を防ぐことが可能となり、さらに、増幅完了までに要する時間が大幅に短縮することが期待できる。(図 1、2 参照)

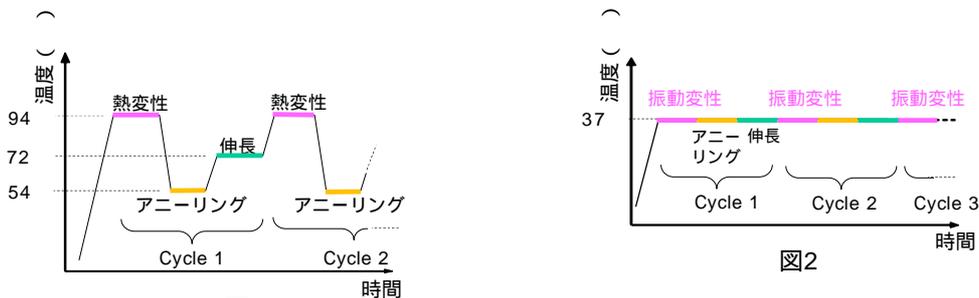


図 1

図 2

3. 研究の方法

(1) 使用した最初の酵素は、37 で至適活性を有する Klenow Fragment である。また、振動による DNA のダメージと塩基配列のズレで生じる効率の低下を補償するため、細胞中で DNA 修復に用いられている校正機能である、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つ BSM 酵素を Klenow と混合することで DNA 増幅の効率を高めた。

条件範囲: 外部パラメータ「振動数 100 ~ 400Hz、振動時間 30 秒以内、アニール伸長時間 30 秒以内」; 内部パラメータ「酵素 Klenow、バッファ種、濃度」。一方、Klenow Fragment は攪拌に弱いので、別の酵素として T4 DNA Polymerase も調べた。

なお、実験に使用した典型的な試薬内容を以下に示す。

Control Primer 1

5' -GATGAGTTCGTGTCGGTACAAC-3'

Control Primer 2

5' -GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3'

酵素、ゲノム DNA、他 H₂O、0.1mL のマイクロチューブに入れ、1 サンプルとした。

(2) レーザー変位計を用い、チューブの振動変位を実測し、そこから DNA 本体に加えられるエネルギーを計算した。

(3) 本研究では、微量の試料を扱えるマイクロチップ型キャピラリー電気泳動法による評価を用いた。キャピラリー電気泳動とは、毛細管現象を利用した電気泳動法である。本実験では、マイクロチップ型電気泳動装置を用いて、振動 PCR 後の DNA の確認を行った。この装置は石英基板

(マイクロチップ)内に形成された分離流路内でキャピラリー電気泳動を行う装置である。分離バッファの充填からサンプルの導入、電圧の印加、分離されたフラグメントの蛍光検出、およびデータ解析まで全て自動で行った。

(4)基本的な溶液構成

DNA (500bp) は、PCR 法で $1.00\text{ng}/\mu\ell$ 以上に増幅させたものを実験に用いた。

その他試薬の構成を以下に示す。

Reaction Buffer、dNTP Mixture、プライマー1、プライマー3、 H_2O 、酵素

4. 研究成果

(1)振幅特性を用いたエネルギー

レーザー変位計により振動子の変位を測定して、さらに、本研究で導出した式により DNA の単位質量当たりに加えられる振動エネルギーを計算により見積もった。

DNA 単位質量当たりの振動エネルギーの計算結果を図 3 に示す。

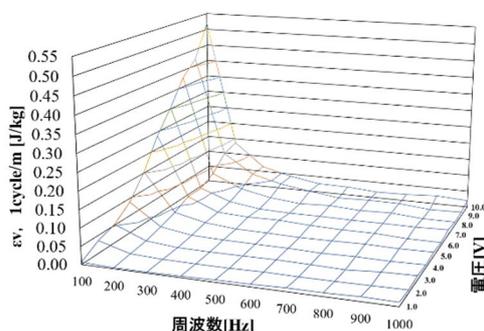


図 3

(2)増幅率の評価方法

実験では、DNA サンプルは、2 種類に分けられ、1 つは振動 PCR のサンプルであり、もう 1 つは増幅の基準となる無振動サンプルである。(2-1)電圧と周波数依存性

実験結果 1

振動条件 1 : 電圧 : 10V、振動時間 : 100s、無振動時間 : 無し、周波数 (振幅) : 100Hz

(0.810mm) 5 サイクル及び 10 サイクル

本実験における実験条件を、キャピラリー電気泳動の解析結果より算出した増幅率及び振動エネルギー特性を図 4 及び 5 に示す。

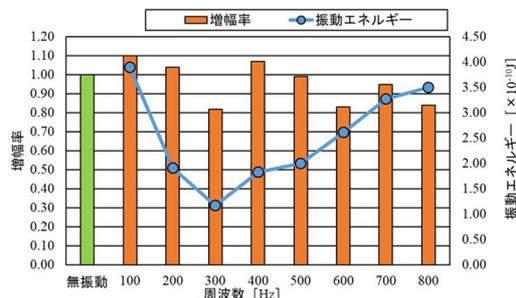


図 4 (5 サイクル)

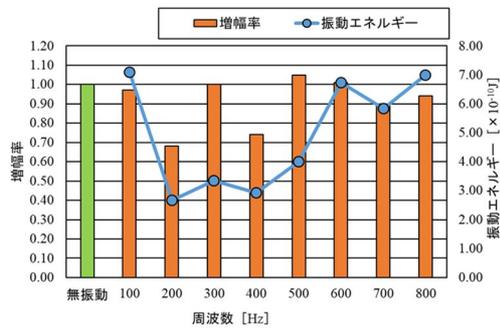


図5 (10サイクル)

無振動サンプルを増幅率の基準値 1.00 倍として、振動サンプルの増幅率を表した。5 サイクル、10 サイクルともに増幅率の変化は見られなかった。電圧が小さいことで、DNA に加えられる振動エネルギーが小さかったためと考えられる。

実験結果 2

電圧 5V, 振動 10s, 無振動 30s, 5 サイクル及び 10 サイクル

本実験における実験条件を図 6 及び 7 に示す。5 サイクルで最大 1.79 倍の増幅率が得られた。その時の条件は、800Hz である。また 300Hz、500Hz、700Hz で、約 1.40 倍の増幅率が得られた。図 7 より、増幅率の変化は見られなかった。700Hz において、増幅率が 0.48 倍と低いが、他の周波数と結果と比較して、振動後の攪拌ができていなかった可能性がある。

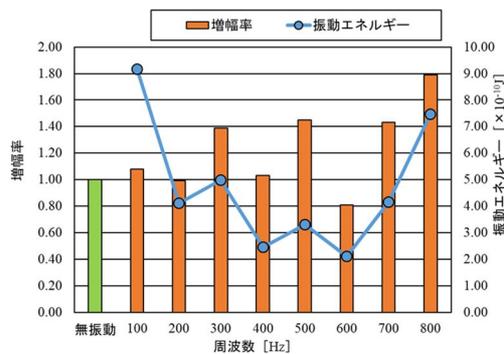


図6 (5サイクル)

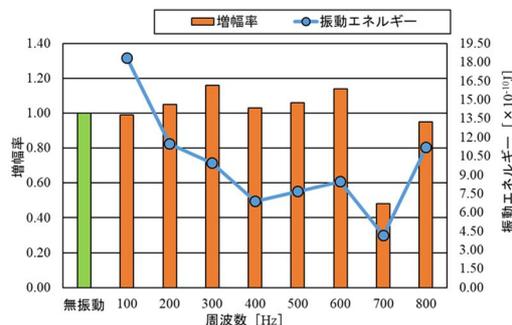


図7 (10サイクル)

実験結果 3

電圧 10V , 振動 10s , 無振動 30s , 5 サイクル及び 10 サイクル

無振動サンプルを増幅率の基準値 1.00 倍として、振動サンプルの増幅率を示す。

図 8 より、300Hz で 1.43 倍の増幅率が得られた。他の周波数では、増幅率の変化は見られなかった。

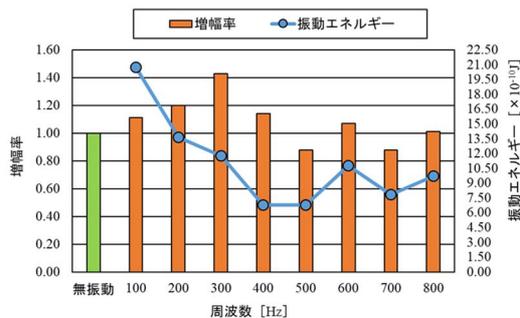


図 8 (5 サイクル)

図 9 より、100 ~ 300Hz において、増幅率が約 0.50 倍と低い。400Hz 以降は、増幅率が 1.00 倍に戻っていく傾向が見られるため、振動エネルギーが大きい場合、強い振動が刺激となつて、DNA 損傷または、酵素失活を引き起こしたと考えられる。

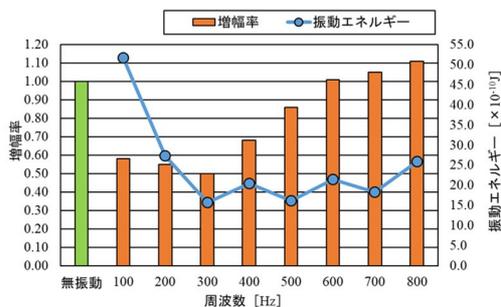


図 9 (10 サイクル)

(2-2) 振動エネルギー依存性

本実験では、前項(2-1)の振動条件 3、10V , 100Hz , 10 サイクルと同じ時間だけ、振動を加えることで、増幅率が低くなる原因を探った。10 サイクル時と同じように、3つのサンプルすべて増幅率が低下した。この結果より、増幅率が低い原因として、DNA が変性時に損傷を受け、1本鎖 DNA のまま分解し、2本鎖 DNA に戻らなくなったことが考えられる。一方で、短いサイズの DNA が増幅していることから、酵素の失活は無かったと推察できる。

最後に、再現性は低いが、本研究を通して得られた最大増幅率は、周波数 : 400Hz、電圧 : 5V、振動 10s、無振動 30s を 1 サイクルとした場合に、サイクル数 5 で、18 倍 ~ 22 倍を得ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryu Kobayashi, Seiji Yoneda, and Shigeo Yamaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA amplification by sound and ultrasound frequency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 23rd International Congress on Acoustics	6. 最初と最後の頁 4808-4812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryu Kobayashi, Seiji Yoneda, and Shigeo Yamaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Precise control of DNA denaturation and amplification by vibration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Extended abstract of the 8th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林 立, 米田征司, 山口栄雄
2. 発表標題 可聴周波数振動のDNA増幅への応用
3. 学会等名 2019年電気学会産業応用部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Kobayashi, S. Yoneda and S. Yamaguchi
2. 発表標題 DNA amplification by sound and ultrasound frequency vibration
3. 学会等名 23rd International Congress on Acoustics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Kobayashi, S. Yoneda and S. Yamaguchi
2. 発表標題 Precise control of DNA denaturation and amplification by vibration
3. 学会等名 8th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林立、鈴木温、米田征司、山口栄雄
2. 発表標題 振動法によるDNA変性機構と増幅
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林立、鈴木温、米田征司、山口栄雄
2. 発表標題 可聴周波数振動によるDNA変性と増幅
3. 学会等名 日本音響学会2018年秋季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林立、清水慶太郎、鈴木温、米田征司、山口栄雄
2. 発表標題 可聴周波数振動によるDNA変性機構と増幅
3. 学会等名 電子情報通信学会超音波研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水慶太郎、小林立、鈴木温、米田征司、山口栄雄
2. 発表標題 振動法によるDNAの変性と定量評価
3. 学会等名 電子情報通信学会超音波研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名倉雅人、鈴木温、米田征司、山口栄雄
2. 発表標題 振動子駆動による振動新PCR法の開発
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	米田 征司 (Yoneda Seiji) (40343636)	神奈川大学・工学部・准教授 (32702)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------