

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12525

研究課題名(和文) 振動を用いた秒速DNA増幅装置の開発

研究課題名(英文) Very rapid DNA Amplification system using vibration method

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高温での熱変性に代わる手法として、本研究者が見いだしたDNAの振動変性を用い、超高速かつ室温での等温PCRを目標とした。定量評価として、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置(Multina)を使った実験を行った。基準振動から周波数が増加するにつれ、スペクトルの積分強度が増大し、DNAが増幅していることが分かった。一方、周波数の低い領域では、低サイズにピークが生じ、DNAが振動により分解している可能性を示唆した。したがって、適度な周波数と振幅が存在すると思われる。

研究成果の概要(英文)：We studied on the fabrication of very rapid polymerase chemical reaction (PCR) system without the conventional thermal cycle, which generally damages DNA and enzymes. To overcome the problem, we have been targetting the development of very rapid PCR system performing with speed per second. In this study, we used a vibration method which we discovered previously, and a vibration unit composed of a coil and magnets was used. We examined DNA amplification on the condition that vibration frequency ranged from 100Hz to 1000Hz and applied voltage was altered from 0V to 20V. Electrophoresis and quantative evaluation using Multina system revealed that our template rambda DNA was amplified at over 170Hz.

研究分野：半導体工学応用

キーワード：核酸 増幅 振動 周波数

1. 研究開始当初の背景

当初、直接電流駆動型ペルチェ素子を用い、高速熱サイクルを有する PCR システムの開発を行ってきた。その過程で、時定数の電流依存性のメカニズムを明らかにしてきたが、熱サイクルを使う限り、速度と精度に限界があることが分かった。元来、強力で広く用いられている DNA 増幅法は PCR 法であるが、通常、94 : 熱変性、54 : アニールリング、72 : 伸長の3種の温度間で熱サイクルが必要となる(図1参照)。

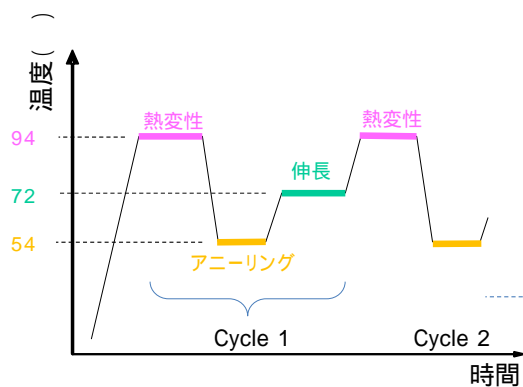


図1 PCR 熱サイクル

とくに、DNA を変性させるために、94 という高温加熱を必須としている点が問題であり、この高温下での反応のため、DNA や酵素の損傷、及び熱サイクルを用いることにより長時間を有し、長時間高温に DNA が晒されることで更に損傷が進む等の問題が内在する。他の DNA 増幅法においても、PCR 法と同様の問題を有している。これに対し、本課題では、こういった高温での熱変性に代わる手法として、本研究が見いだした DNA の振動変性を用い、DNA を含んだ試薬全体を可聴周波数領域で、室温での等温 PCR を狙ってきた(図2参照)。

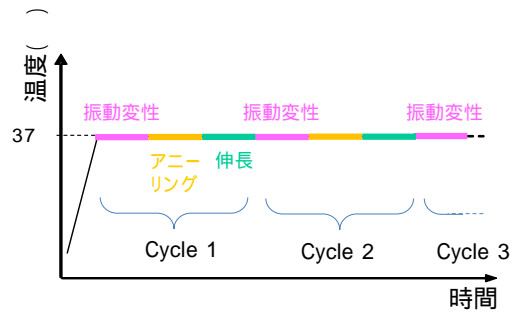


図2 振動 PCR

とくに、37 という生命体の活動温度での DNA 増幅を可能なため、水溶液中の DNA や酵素などへの熱的ダメージが大幅に減少することが期待できる。

2. 研究の目的

大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ酵素である Klenow Fragment を使うことで、原理的に、大腸菌内での複製スピード 1000bp/sec から、従来速度に対し、1/1000 に時間短縮できることが期待できる。

本研究では、DNA 水溶液の入ったチューブ自体を高速に振動させることによる、可聴周波数での DNA 変性技術を基にし、新しい DNA 増幅法システム開発を目的とした。従来、遺伝子発現機構を調べるためには、細胞を殺して取り出す他はなかった。死状態の DNA から得られた情報と、生きた状態での本来の遺伝子発現とは異なる可能性が指摘されている。従来手法のおよそ 1/1000 のスピードと 37 という生命体温度で DNA 増幅という優位性により、従来不可能であった、生きた細胞や生体内での PCR の実現が期待でき、リアルタイムでの遺伝子発現の解明に繋がる技術となり得る。さらに、従来の PCR に必須であった加熱冷却の時間が不要でなくなるため、DNA の増幅に要する時間が三桁程短縮され、診断・解析に要する時間も大幅に短縮される。感染症ウイルスや細菌検査などは、疾病原因の早期発見、早期治療に繋がり、罹患者の生

命が守られ、感染の拡大を抑えることが可能となる。そのために、正確で早い DNA 分析が望まれるが、現状では、精度や時間の点で改良余地が十分残されている。

PCR 法では 3 種の温度間で熱サイクルを実施するが、申請者らはこれまで、この熱サイクルを正確かつ高速に実施可能な熱応答性の極めて高いペルチェ素子と駆動電源を提案・開発し、市販 PCR 装置に比べ特異性の高い DNA 増幅に成功した。しかしながら、研究を推し進めるに従い、熱サイクルを使う限り、i) 温度昇降に時間を要し、ii) 高温熱変性による DNA や酵素へのダメージと酵素の失活が避けられず、結局、大幅な時間短縮は原理的に難しいと判断するに至った。そこで本研究者は、検体を 37 近傍の低温に維持し、可聴周波数で DNA 溶液自体を振動させることで PCR を行う技術の可能性を探ることを目標とした。

この技術開発により、早期感染症診断を実現し、診断に要する時間を劇的に短縮、かつ、検体や酵素の熱損傷を防ぐことで早期正確な治療が期待できる。また、生命体と同じ 37 で増幅を行うため、生細胞内、核内での DNA 増幅が期待できる。

3. 研究の方法

試薬入りチューブを可聴周波数で高速振動させる振動子装置を自作し、これを用いて、まず、DNA の振動変性実験を実施し、振動による変性を確認した。

振動装置の改良のために、この変性実験と振動子の周波数や振幅との関係を変性機構に絡めて理解する必要がある。そこで、まず、この現象の理論と変性実験との比較検討を行った。ここで、以下のようなモデルを提案した。

ε_c : DNA が振動 1 サイクルで受けた全エネルギー、 m : DNA 球の質量、 f : 振動周波数、 A : チューブの振幅、 Δt : 振動トータル時間とす

ると、下記関係式が得られる。

$$\varepsilon_c = 8\pi^2 m A^2 f^3 \Delta t$$

この ε_c から見積もると、報告されている DNA の自由エネルギー 1 モル当たり、約 30[kJ/mol] に非常に近いことが分かった。

次に、この理論的側面の検討と併行して、37 近傍での振動による PCR の実験を行った。振動 PCR で用いる水溶液試薬内容は以下のものを基礎とした。

10×Buffer 5 μ L、dNTP Mixture 4 μ L (液最終濃度各 200 μ M)、Control Primer (Control Primer A: 配列番号 1、Control Primer B: 配列番号 2) 各 0.5 μ L (液最終濃度各 0.2 μ M)、Klenow Fragment、1 μ L (液最終濃度 2 units/ μ L)、DNA (鋳型 DNA) (液最終濃度 0.5ng/50 μ L)、H₂O 35.8 μ L、Total 50 μ L。なお、配列番号 1 の配列は、5' -GATGAGTTCGTGTCCGTACAAC-3'、配列番号 2 の配列は、5' -GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3' である。上記反応液 15 μ L を 0.1mL のマイクロチューブに入れ、サンプルとした。

4. 研究成果

図 3 に示すように、ゲル電気泳動後の SYBRGreen 及び SYBRGreen による染色を経て、DNA の振動による変性を再現性良く確立していることが確認できた。ここで、SYBRGreen は二本鎖のみを染色、SYBRGreen は一本鎖及び二本鎖に同程度の割合で染色する性質を利用している。

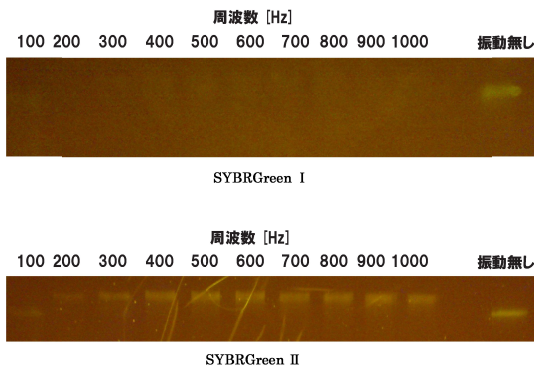


図3 電気泳動

さらに、次の実験を行った。サンプルである核酸水溶液に、130Hz（波形サイン波）で、15秒振動を与え、その後、15秒静止した。振動15秒、静止15秒を1サイクルとし、3、5、7のサイクル数で実験を行った。温度は37に一定に保って行った。図4に示すように、振動を一切与えず、37保持のバンドと比べ、僅かであるが、サイクル数の増加とともにより明るく、即ち増幅したことを示している。



図4 電気泳動

更に、定量評価として、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置（Multina）を使った実験を行った。結果を図5に示す。

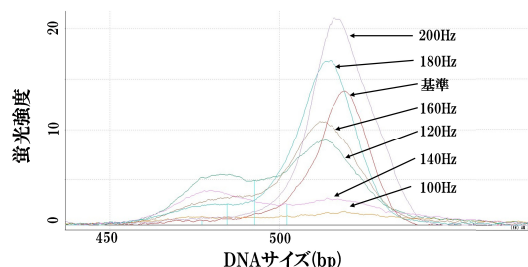


図5 Multinaによる定量評価

基準振動（170Hz）から周波数が増加するにつれ、スペクトルの積分強度が増大している、即ち、DNAが増幅していることが読み取れる。一方、周波数の低い領域では、積分強度が減少し、さらに、低サイズにピークが生じている。これは、DNAが振動により分解している可能性を示唆している。従って、適度な周波数を振幅が存在すると思われる。

参考文献

Shigeo Yamaguchi, Tadzunu Suzuki, Kazuhito Inoue, and Yoshitaka Azumi, DC-driven thermoelectric Peltier device for a precise PCR system, Japanese Journal of Applied Physics 54, 057001-1-4 (2015).

Shigeo Yamaguchi and Hideyuki Homma, Fabrication of a unipolar Peltier device using a pair of N-type thermoelectric materials, Microelectronic Engineering, 129, 77-80 (2014).

Shigeo Yamaguchi, Temperature control device and temperature element, WO 2012172884 A1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shigeo Yamaguchi and Toru Anzai, Impact of temperature dependence of resistivity on thermal time constant of direct-current-driven Peltier device, Physica Status Solidi C: Current Topics in Solid State, 1700118 (2017) (5pages). [査読有り]

〔学会発表〕(計 2 件)

松下岳史, 鈴木温, 井上和仁, 安積良隆, 山口栄雄, 振動法による DNA 増幅、電子情報通信学会総合大会 3/15-18 九州大 3/17 発表

清水慶太郎, 鈴木温, 米田征司, 山口栄雄, 振動 PCR 法の提案と実証、電気学会 電子・情報・システム部門大会 8/31-9/2 神戸大 8/31 発表

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ee.kanagawa-u.ac.jp/subject/
laboratory.html](http://www.ee.kanagawa-u.ac.jp/subject/laboratory.html)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()