

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14257

研究課題名（和文）薬剤耐性菌の発生リスク軽減を目指した高速かつ正確なDNAシーケンス技術の開発

研究課題名（英文）Development of rapid and accurate DNA sequencing technology aimed at reducing the risk of drug-resistant bacteria

研究代表者

古谷 俊介（FURUTANI, Shunsuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60632031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、抗菌薬の不適切な使用による薬剤耐性菌の増加が世界的な問題となっている。本研究では、申請者がこれまでに開発した高速PCR技術に加え、マイクロチップ電気泳動を用いた高速電気泳動技術を組み合わせることで、正確性の高い高速DNAシーケンス技術の開発を目指した。その結果、サンガー法の要素技術である、PCR・蛍光標識・電気泳動を全て高速化することで、40分以内での高速DNAシーケンスが可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案する高速DNAシーケンス技術は、敗血症患者に対して1時間以内での適切な抗菌薬投与を可能とするなど、従来技術では対応できず、医療分野において重要である、特定領域の高速な塩基配列決定を可能とする独創的な技術である。また、本技術の開発によって、感染症における早期の適切な抗菌薬使用による治療が可能となることで薬剤耐性菌の発生リスクを低減することが可能となるため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In recent years, an increase in drug-resistant bacteria due to inappropriate use of antibacterial drugs has become a global problem. In this study, we aimed to develop highly accurate and rapid DNA sequencing technology by combining the rapid PCR technology that we have developed with the rapid electrophoresis technology using microchip electrophoresis. As a result, it was confirmed that rapid DNA sequencing within 40 minutes is possible by accelerating all of the elemental technologies of the Sanger method, PCR, fluorescence labeling, and electrophoresis.

研究分野：分析化学

キーワード：迅速検査 DNAシーケンサー 塩基配列 PCR 電気泳動 マイクロチップ 敗血症 薬剤耐性菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬の不適切な使用を背景に、薬剤耐性菌が増加している。一方、企業による新たな抗菌薬の開発は減少傾向であるため、薬剤耐性菌の増加は国際社会でも重要な課題となっている。現在のペースで薬剤耐性菌が増加した場合、2050年には癌の死亡者数を上回るとの報告(厚労省、薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン(2016-2020))があり、適切な抗菌薬使用を実現する技術開発が求められている。一方、診断後一刻も早く原因菌の特定が必要な敗血症での細菌同定では、診断後1時間以内の適切な抗菌薬の処方により、死亡率が有意に低下することが報告されている(Gaieski D.F., et al., Crit Care Med, 1045-1053, 2010)にもかかわらず、高速な細菌同定技術がないため、医師の判断で多剤併用治療や広域抗菌薬の使用が行われるため、薬剤耐性菌の発生リスクを常に抱えていることが問題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、医療分野において求められる遺伝子の特定領域を高速かつ正確に塩基配列決定するDNAシーケンス技術の確立である。

従来、いわゆる高速DNAシーケンサーとして次世代シーケンサーの開発が行われてきた。しかし、次世代シーケンサーはサンガー法に比べ、読み取り精度が低いことから、迅速な配列決定には基準となるレファレンス配列が必要であり、未知の配列の場合は、何度も繰り返し塩基配列を読むことで正確性を担保する必要があった。そのため、敗血症の原因菌特定や薬剤耐性菌の診断など、迅速かつ正確な塩基配列決定が必要な場合には対応できていない。本研究では、従来技術では対応できず、医療分野において重要である、特定領域の高速な塩基配列決定を可能とする高速DNAシーケンス技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、以下の4つの項目に分けて研究を進めた。

(1) 16S rRNA 遺伝子に対するPCRと蛍光標識の高速化

日本薬局方においてDNAシーケンスでの細菌の同定に指定されている16S rRNA遺伝子に対するPCRと蛍光標識を、超高速リアルタイムPCRシステムを用いて高速化した。PCRでは、DNAシーケンスに必要な800bpの産物を得るために、酵素濃度、プライマー濃度の条件検討を行い、高温と低温でのそれぞれに必要な最短の反応時間を調べた。蛍光標識の反応では、BigDye試薬を用いて、試薬濃度の検討により最適な高速条件を確認した。

(2) マイクロチップ電気泳動での蛍光検出を行う光学系の構築

本研究では蛍光標識にBigDye試薬を使用し、塩基配列のA, T, G, Cに4種類の蛍光標識を行い、これらをマイクロチップ電気泳動中に大きさ別に検出するための光学系を構築した。ここでは、顕微鏡に付属の水銀ランプをバンドパスフィルを通すことで、488 nmの励起光として顕微鏡に導入し、顕微鏡のステージ上で電気泳動によって流れてくるサンプルに照射し、DNAの5'末端のA, T, G, Cに標識した4種類の蛍光(525 nm, 555 nm, 580 nm, 590 nm以上)を、ダイクロイックミラーを用いて分光し、それぞれをフォトセンサによって検出する光学系を設計・構築した。

(3) マイクロチップ電気泳動での高速分離条件の検討

構築した光学系を用いて、マイクロチップ電気泳動での16S rRNA遺伝子の1塩基レベルで分解能を有した高速分離を行うために高分解能の分離ポリマーの選定及び電気泳動条件の最適化を行った。分離ポリマー中にコーティング要素も含まれたPOP系の分離ポリマーと、高

分解可能な分離が可能なポリジメチルアクリルアミド (PDMA) 系の分離ポリマーを比較検討し、最適な分離ポリマーを選定した。また、電気泳動条件として分離ポリマー毎に最適な電圧条件を検討する。最終的に、最適な電気泳動条件での解読可能な塩基配列の長さから、分離ポリマーの選定と電気泳動の最適条件を決定した。

(4) 高速 DNA シーケンスによる高速細菌同定

ここまでで検討した条件で、高速 PCR、蛍光標識、高速電気泳動を統合することで、特定領域の塩基配列を決定する可能とする高速 DNA シーケンスとして、モデル細菌として大腸菌を用いて 40 分以内での高速 DNA シーケンスが実現可能かを評価した。また、市販装置と比較し、開発装置を評価した。

4. 研究成果

(1) 16S rRNA 遺伝子に対する PCR と蛍光標識の高速化

これまでに開発した高速 PCR システムを用いて、試薬濃度の最適化を行ったところ、酵素濃度 0.1U/μL、プライマー濃度 1.5 μM が最も PCR 効率が良いことが確認された。また、800 bp の PCR を 15 分以内で実現可能であった。蛍光標識は試薬濃度を高速反应用到に最適化した上で、初期のテンプレート濃度を増やすことで、10 分程度で実現可能であることを確認し、合計で 25 分以内で実現可能であることを確認した。

(2) マイクロチップ電気泳動での蛍光検出を行う光学系の構築

本研究では、顕微鏡のステージ上でマイクロチップ電気泳動を行い、顕微鏡付属の水銀ランプの光を、バンドパスフィルタを用いて 488 nm にした励起光を当て、BigDye で 5' 末端毎に 4 種類に蛍光標識された DNA 断片を大きさ別に検出し、得られた 4 種類の蛍光をダイクロイックミラーを用いて分光して 4 つのフォトセンサで同時に検出可能な光学系を作成した。また、それに合わせて、4 つのフォトセンサを同時に動作可能なソフトウェアを LabVIEW を用いて作製した。

(3) マイクロチップ電気泳動での高速分離条件の検討

分離ポリマーの検討では、5%濃度の PDMA ポリマーを用いることで、一塩基レベルでの分離が可能であり、235 V/cm の分離電圧をかけることで、37 mm の分離長では約 7 分での分離が可能であることが確認された。

(4) 高速 DNA シーケンスによる高速細菌同定

高速 PCR と蛍光標識を 25 分、マイクロチップ電気泳動を 7 分で実現し、合計 40 分以内のサンガー法に基づく DNA シーケンスが実現可能であることを確認した。また、市販の DNA シーケンサーとデータを比較して評価することで、7 割程度の精度で、塩基配列を確認可能であることが確認された。

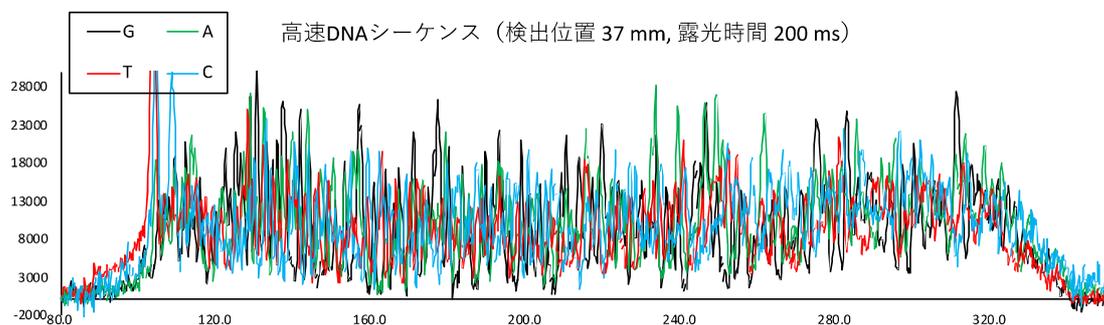


図1 マイクロチップ電気泳動での高速 DNA シーケンス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Izumi Kubo and Shunsuke Furutani	4. 巻 -
2. 論文標題 Compact disc-type biosensor devices and their applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications	6. 最初と最後の頁 223-235
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 有
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 該当する

1. 著者名 Izumi Kubo, Mitsutoshi Kajiya, Narumi Aramaki and Shunsuke Furutani	4. 巻 20
2. 論文標題 Detection of Salmonella Enterica in Egg Yolk by PCR on a Microfluidic Disc Device Using Immunomagnetic Beads	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s20041060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古谷 俊介、西尾 敬子、鳴石 奈穂子、赤澤 陽子、萩原 義久、吉田 康一、永井 秀典
2. 発表標題 CD 型マイクロ流体デバイスを用いた糖尿病診断のための高速 ELISA の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 古谷俊介、永井秀典
2. 発表標題 超高速リアルタイムPCRシステムを用いた結核菌遺伝子の迅速検出
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会 総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 永井秀典、古谷俊介、鳴石奈穂子、高島瑞紀、岩浪哲、塩野谷通
2. 発表標題 感染症の多項目同時検査を可能とする超高速リアルタイムPCRシステムの開発
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会 総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 岩浪 哲、高島瑞紀、塩野谷通、古谷俊介、鳴石奈穂子、永井秀典
2. 発表標題 GeneSoC: 超高速核酸増幅技術による微生物遺伝子検査のパラダイムシフトの可能性
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会 総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 古谷 俊介、齋藤 真人、民谷 栄一、永井 秀典
2. 発表標題 サンガー法に基づく高速なDNAシーケンス技術の開発
3. 学会等名 第38回 キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計11件

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-092559	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 感光性樹脂積層体を用いた多積層型マイクロ流路デバイスの製造方法	発明者 永井秀典、古谷俊介、水村華菜子、小谷雄三	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-111686	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マイクロ流路デバイス用感光性樹脂積層体	発明者 永井秀典、古谷俊介、小谷雄三	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-181455	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、201910720912.9	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 PCR反応容器	発明者 永井秀典、古谷俊介、久保秀泰	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/034008	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、16/782794	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 分析用トレー	発明者 永井秀典、古谷俊介、阿部佳織、今井正、工藤岳史、坂井	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-012183	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 PCR反応容器	発明者 永井秀典、古谷俊介、久保秀泰	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-161316	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マイクロ流路用感光性樹脂積層体	発明者 永井秀典、古谷俊介、小谷雄三	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-186690	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マイクロ流路デバイス用感光性樹脂積層体	発明者 永井秀典、古谷俊介、小谷雄三	権利者 産業技術総合研究所 他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-186731	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-219281	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計3件

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特 6519888	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井秀典、古谷俊介、萩原義久、淵脇雄介	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特 6530548	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸増幅装置、核酸増幅方法及び核酸増幅用チップ	発明者 永井 秀典、古谷 俊介、萩原 義久、淵 脇 雄介	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特 6460362	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----