



次世代のアプローチ

ドロップレット

水滴の世界が作り出す

シングルセル × スクリーニング

の最先端研究

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

Introduction

細胞には一つひとつ“個性”が存在するため、集団からの目的細胞スクリーニングや個々の機能の特徴付けするシングルセル解析の重要性は高まっています。その応用例は、最も普及しているシングルセルRNA-seqから、酵素や抗体の高生産株スクリーニング、環境や腸内由来の微生物単離など多岐にわたります。そのような背景の中、数千から数十万単位の細胞の培養/反応/選別をハイスループットに行える手法として、“ドロップレット”技術が注目を集めています。我々が定義するドロップレットとは、直径20-200 μm 程度の微小水滴を指し、大きく油中水滴型(Water-in-Oil)ドロップレットとゲルマイクロドロップ (GMD)の2種類に分類できます。

油中水滴型 (Water-in-Oil) ドロップレット

- ・構造：水滴(培地など)がオイル中に分散し、界面活性剤により安定化したエマルジョン。
- ・特徴：オイルで隔てられているため、各ドロップレットで微生物/細胞が増殖し、代謝物が蓄積されていく。ドロップレット作製時に基質を加えることで培養に伴う代謝物を検出できる。
- ・用途：微生物培養、環境微生物/変異株スクリーニング、酵素の指向性進化 など

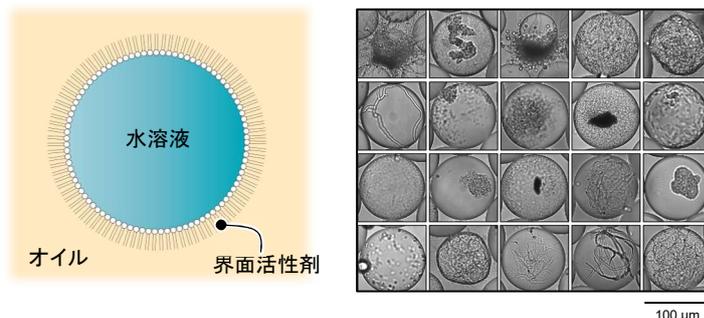


図0-1. 油中水滴型ドロップレットの模式図(左)と環境微生物の培養(右)

関連ページ ▶▶▶ [01](#) [02](#) [03](#) [04](#) [05](#)

ゲルマイクロドロップ (GMD)

- ・構造：内部がゲル化したドロップレット。
- ・特徴：オイルではなく、培地等に分散することができるため、ドロップレット内外における物質の透過性が高い。一方で、ゲルを足場として細胞やビーズ、ゲノムなどの比較的大きな物質は保持される。
- ・用途：細胞培養、変異株/抗体産生細胞スクリーニング、微生物間相互作用研究 など

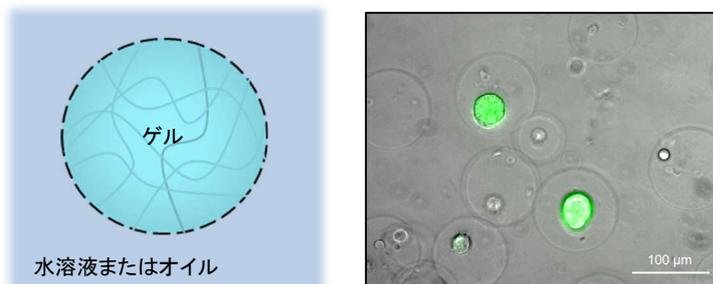
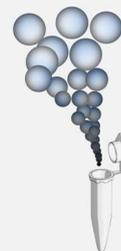


図0-2. GMDの模式図(左)とガン細胞の培養(右)

関連ページ ▶▶▶ [06](#) [07](#) [08](#) [09](#)

▶ドロップレットの強み

- ① 高効率：シングルセルを封入したドロップレットを**10分間で数百万以上**の効率で作製。
- ② 小型化：ドロップレットの体積は非常に小さいため、**希少な試薬を節約**。また、数百万以上のドロップレットを**1本のマイクロチューブで保存可能**。
- ③ 反応場：一つひとつが反応/培養器として機能し、シングルセルレベルでの**酵素反応、分泌物の定量化**などが実現。



ドロップレットは従来よりも高効率にシングルセル解析を可能にするツールとして、ハイスループットスクリーニングを始め多くの分野に導入されています。本集では様々な実例を収録しており、ドロップレットの全体像を幅広く、かつ深く理解できる構成となっております。

ドロップレット技術を基盤とする未培養微生物の単離を目指した
次世代型培養手法の確立

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門
野田尚宏 先生

01

新規親水性蛍光プローブACAによるドロップレット内部での微生物由来酵素活性の評価とハイスループットスクリーニング

長岡技術科学大学 技術科学イノベーション専攻
小笠原渉 先生, 中村彰宏 先生

02

糸状菌 *Trichoderma reesei* の新規形質転換法の構築

長岡技術科学大学 技術科学イノベーション専攻
小笠原渉 先生, Luu Xuan Chinh 先生

03

培養空間の区画化がもたらす多様性への影響

九州大学 生命機能科学部門
田代康介 先生

04

病原菌の拮抗微生物大規模迅速スクリーニング法

理化学研究所 バイオリソース研究センター
市橋泰範 先生, 成川 恵 先生

05

微生物の増殖活性・物質産生量を同時評価する二次元スクリーニング

長岡技術科学大学 生物機能工学専攻
小笠原渉 先生, 田中裕真 先生

06

On-chip® Sortを用いたゲルマイクロドロップによる腸内細菌の
ハイスループットスクリーニングの可能性

慶應義塾大学 先端生命科学研究所
福田真嗣 先生

07

目的タンパク質高産生株単離のための
変異株ライブラリのハイスループットスクリーニング

金沢工業大学 大学院工学研究科
町田雅之 先生

08

Nanovialを用いた抗体産生細胞の
ハイスループットシングルセルスクリーニングの実例

カリフォルニア大学ロサンゼルス校 バイオエンジニアリング分野
Joseph de Rutte 先生, Dino Di Carlo 先生

09

ドロップレット技術を基盤とする未培養微生物の単離を目指した次世代型培養手法の確立

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門
野田尚宏 先生

環境中には多種多様な微生物が生息していますが、99%以上は未培養であると言われています。これまで環境微生物培養のために寒天平板法や限界希釈法が使用されてきましたが、前者は増殖の速い微生物が優先的に増殖するため増殖の遅い微生物が淘汰されやすいこと、後者は操作が煩雑かつ低スループットであることが問題です。そこで近年、これら問題を解決する方法として、非常に少ないスペースで数百万種の微生物を分離した状態で培養できる油中水滴型ドロップレットが注目されています。

しかしながら、数百万のドロップレットの中から、増殖速度の異なる多様な微生物をそれぞれ検出し、分取するのは技術的に難しく、環境微生物の単離株を獲得するうえで大きな課題となっていました。そこで、産業技術総合研究所の野田先生らのチームでは、微生物が増殖したドロップレットを蛍光で検出する手法としてFNAP-sort (Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting) を考案しました。本手法は、FRET(Fluorescence resonance energy transfer)により消光状態の蛍光核酸プローブが微生物の増殖に伴って生じるRNaseによって切断されることで、FRETが解消されて蛍光するという原理です(図1-1. A)。

まずはFNAP-sort原理実証として、蛍光核酸プローブ、大腸菌、LB培地をドロップレットに封入して培養しました(図1-1. B)。培養1日後には大腸菌が増殖したドロップレットが強い蛍光を発しており、蛍光ドロップレットと非蛍光ドロップレットをはっきりと識別できました(図1-1. C)。On-chip® Sortを用いて蛍光ドロップレットをソーティングしたところ、内部で大腸菌が増殖した蛍光ドロップレットが選択的に回収されていることが確認できました(図1-1. D, E)。

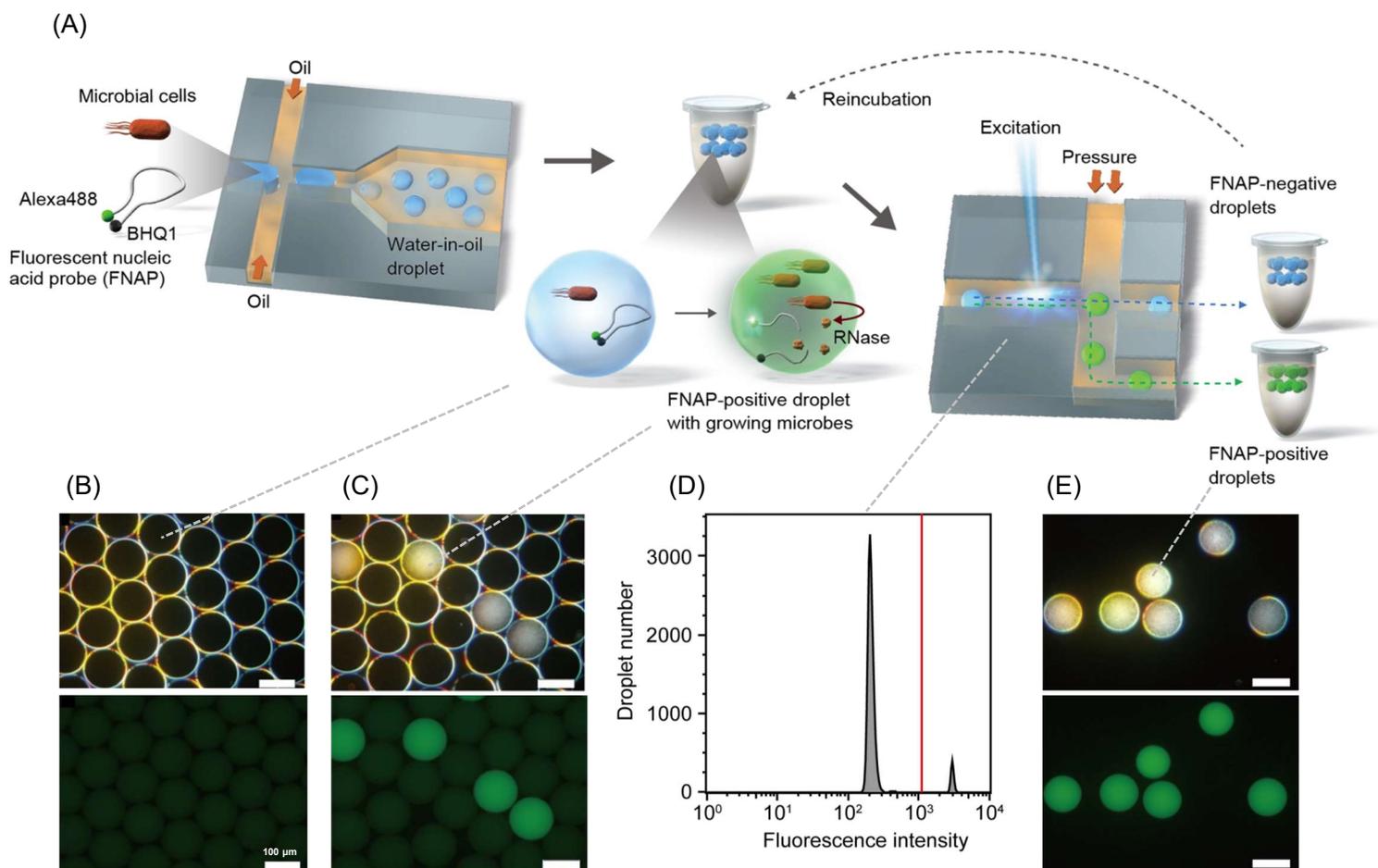


図1-1. FNAP-sortワークフローと原理実証

(A) FNAP-sortワークフロー (B) 作製直後のドロップレットの顕微鏡写真 (C) 1日培養後のドロップレットの顕微鏡写真 (D) 培養1日後のドロップレットの蛍光ヒストグラム (E) ソーティングドロップレットの顕微鏡写真 (B), (C), (E)について上図は暗視野、下図は蛍光視野

土壌微生物を蛍光核酸プローブと一緒にドロップレットに封入し、FNAP-sortを実施したところ、培養日数によってソーティングされる微生物種が異なりました。これは微生物の増殖速度を指標としたソーティングが可能であることを示唆しています。(図1-2)。

On-chip® SortとFNAP-sortによって、ドロップレット内部での微生物の増殖確認とその分取が可能になりました。つぎにこれらの微生物を単離培養するため、マイクロウェルへのドロップレットの分注について検討しました(図1-3. A)。ソーティングした水圏由来微生物を含む蛍光ドロップレットをOn-chip® SPiSを用いてマイクロウェルプレートに1つずつ分注しました(図1-3. B)。分注後、スケールアップ培養を試みたところ、いくつかのウェルで微生物が良く増殖した様子が観察されました(図1-3. C)。各ウェルの菌叢解析を行った結果、サンプル採取源の水圏では存在率0.1%以下だった微生物を99%以上の純度で培養できたことが示されました(図1-3. D, 5-N17, 5-N15, 2-B12, 2-J16, 2-J3)。さらに、複数種の微生物が存在していたウェルもあり、共生関係のある微生物の組み合わせを調べる方法としての可能性も見出しています。

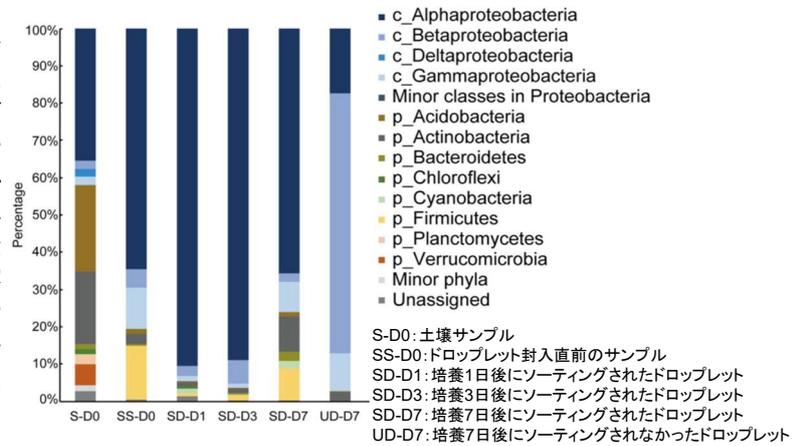


図1-2. 土壌由来微生物を用いたFNAP-sortによってソーティングされたドロップレットの菌叢解析

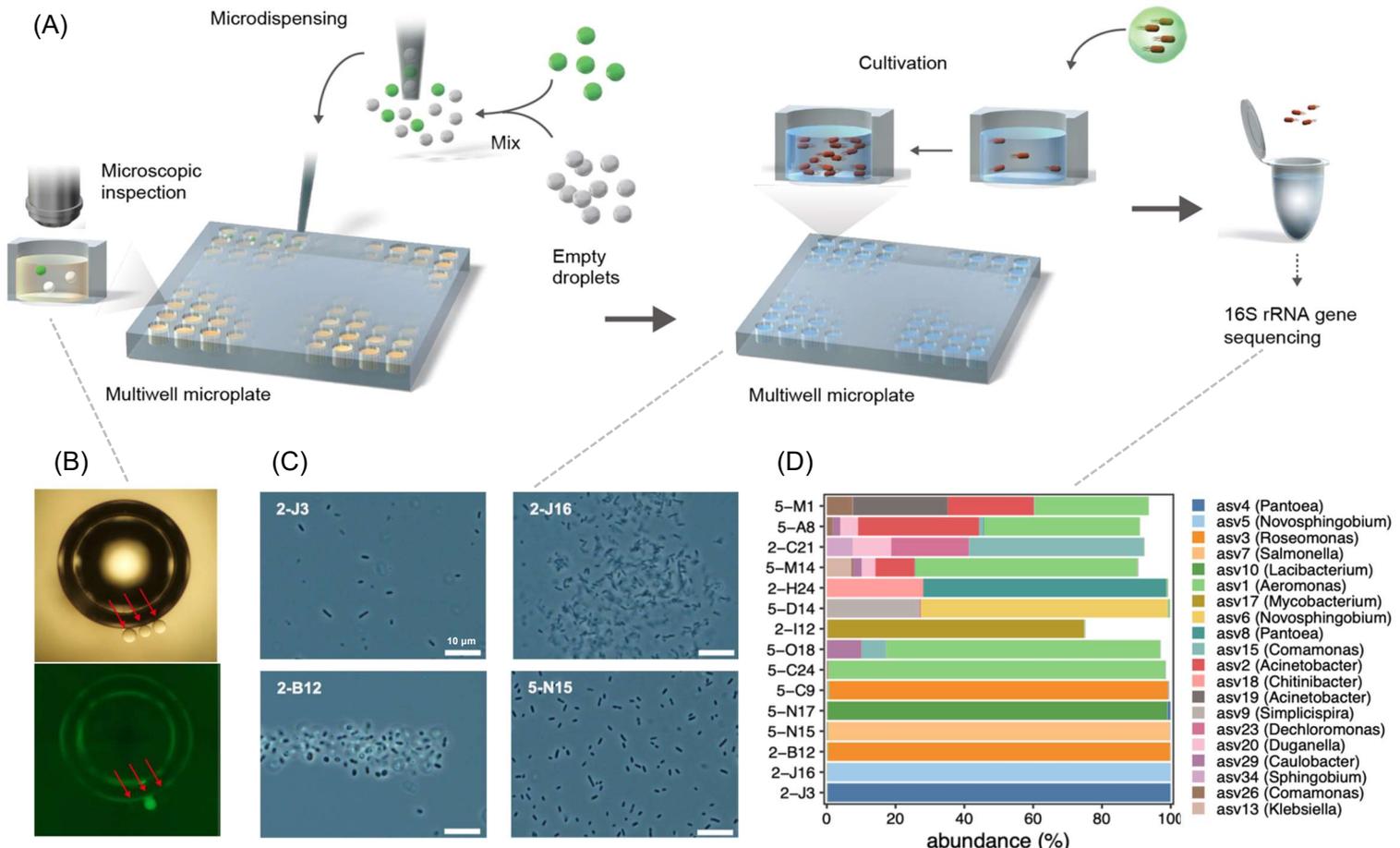


図1-3. On-chip® SPiSを用いたドロップレット分注とシングルドロップレット由来微生物のスケールアップ培養

(A) ドロップレット分注・解析ワークフロー (B) 分注されたドロップレットの顕微鏡写真、上図は明視野、下図は蛍光視野 (C) 分注されたドロップレット由来微生物のスケールアップ培養後の顕微鏡写真 (D) ドロップレットが分注されたウェル内の菌叢解析

以上、FNAP-sortとドロップレット分注を組み合わせた微生物培養・解析手法を確立し、実際に50万個以上のドロップレット内で培養した環境微生物の中から、環境中で存在率の極めて低い微生物を高純度で獲得することに成功しています。ドロップレット培養とその内部の微生物の増殖を菌種を問わずに検出できる本手法は、新たな未培養微生物の獲得に幅広く利用されることが期待されます。

Reference

Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort) as a high-throughput screening method for environmental bacteria with various growth rates

Ota, Y., Saito, K., Takagi, T., Matsukura, S., Morita, M., Tsuneda, S., Noda, N.

PLOS One **2019** *14*(4), e0214533.

DOI: 10.1371/journal.pone.0214533 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0214533>

Microdroplet-based system for culturing of environmental microorganisms using FNAP-sort

Saito, K., Ota, Y., Tourlousse, D. M., Matsukura, S., Fujitani, H., Morita, M., Tsuneda, S., Noda, N.

Scientific Report **2021** *11*(1), 9506.

DOI: 10.1038/s41598-021-88974-2 <https://www.nature.com/articles/s41598-021-88974-2>

新規親水性蛍光プローブACAによるドロップレット内部での微生物由来酵素活性の評価とハイスループットスクリーニング

長岡技術科学大学 技術科学イノベーション専攻
小笠原 渉 先生, 中村 彰宏 先生

油中水滴型ドロップレット(Water-in-Oil droplets; WODLs)は、それぞれのWODLsを微小な反応槽とみなすことで、通常の細胞表面マーカーによる染色では検出することのできなかつた細胞の代謝活性や酵素反応を経時的に解析することも可能です。しかし、これら生理活性の検出に用いる蛍光プローブの多くは疎水性であり、水相であるWODLs内部から外部の油相へと拡散してしまうため、大規模スクリーニングへの応用は限定的です。

この課題を解決するため、長岡技術科学大学の小笠原先生らは一般的な蛍光プローブである7-Amino-4-methylcoumarin(AMC)の親水性を向上させた7-Aminocoumarin-4-acetic acid (ACA)を合成、そしてジペプチドを結合させることでWODLs内部に長時間留まる新規蛍光ペプチド基質(Dipeptidyl-ACA)を開発しました。このDipeptidyl-ACAと微生物を含む水溶液をOn-chip[®] Droplet Generatorを用いてWODLs内部に封入することで、培養に伴い微生物が生産したジペプチジルペプチダーゼ(DPP)をWODLs内部で検出することが可能になりました。さらにWODLsを直接ソーティングできるOn-chip[®] Sortと組み合わせることで、環境中から目的の酵素を産生する微生物をハイスループットにスクリーニングできることを示しました(図2-1. A-C)。

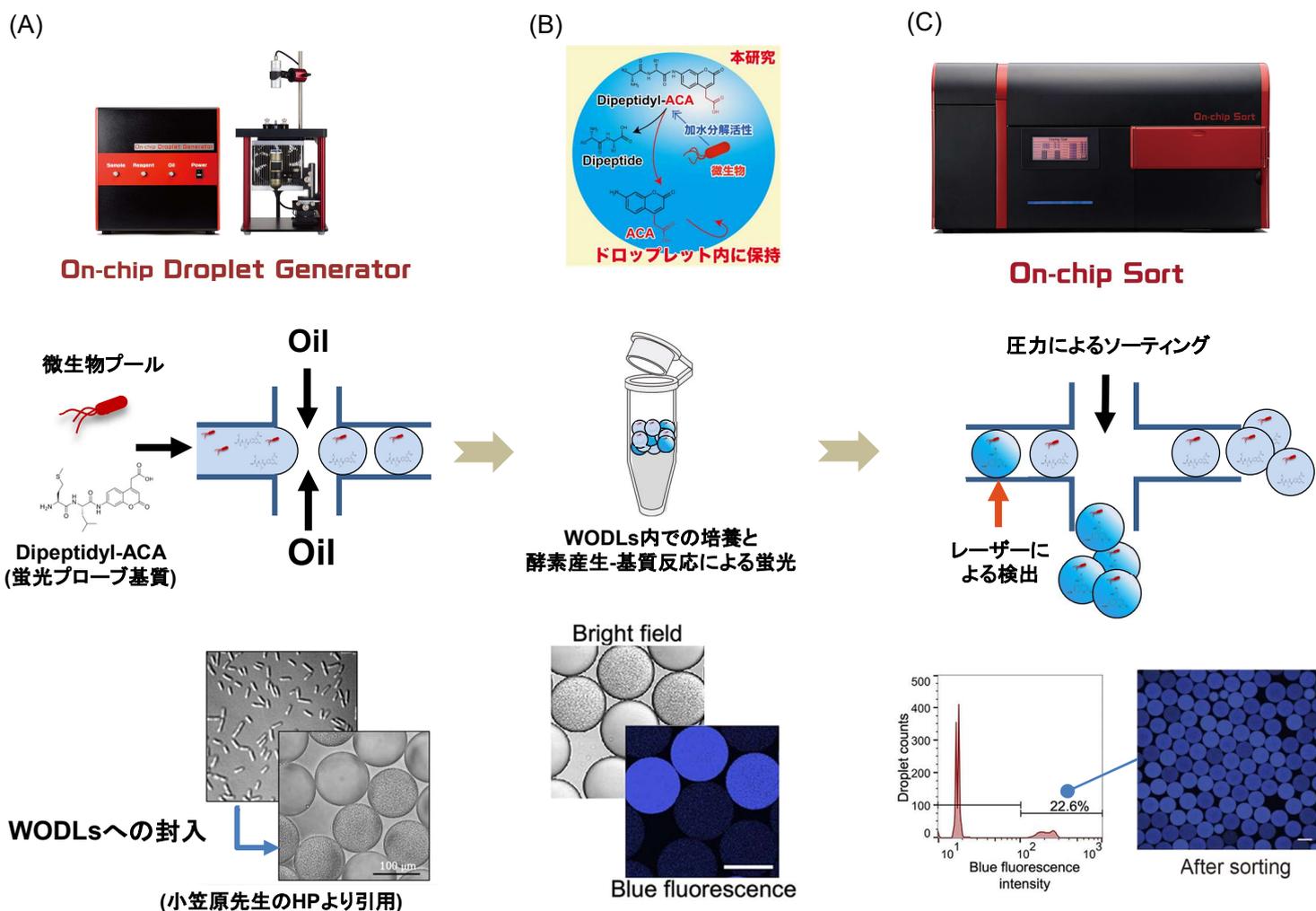


図2-1. On-chip[®] Droplet generator, Dipeptidyl-ACA, On-chip[®] Sortを用いた酵素産生微生物スクリーニングのワークフロー

(A) On-chip[®] Droplet generatorによるDipeptidyl-ACAと微生物を含むWODLsの生成 (B) WODLs内部での微生物培養とDPP活性による蛍光強度の上昇 (C) On-chip[®] Sortによる蛍光シグナル陽性WODLsの検出とソーティングによる酵素高産生微生物の回収

WODLs内にシングルセルで封入した*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24が産生するDPP活性をDipeptidyl-ACAによって青色の蛍光として検出することができました(図2-2. A)。さらにOn-chip[®] Sortを用いたWODLsのソーティングにより、赤色蛍光を発する微生物との混合溶液からDPP活性を示すWODLsのみがソーティングできること(図2-2. B)、FNAP(前頁参照)と組み合わせる事で増殖する微生物の中でもDPP活性を示す微生物のみをスクリーニングすることができました(図2-2. C)。

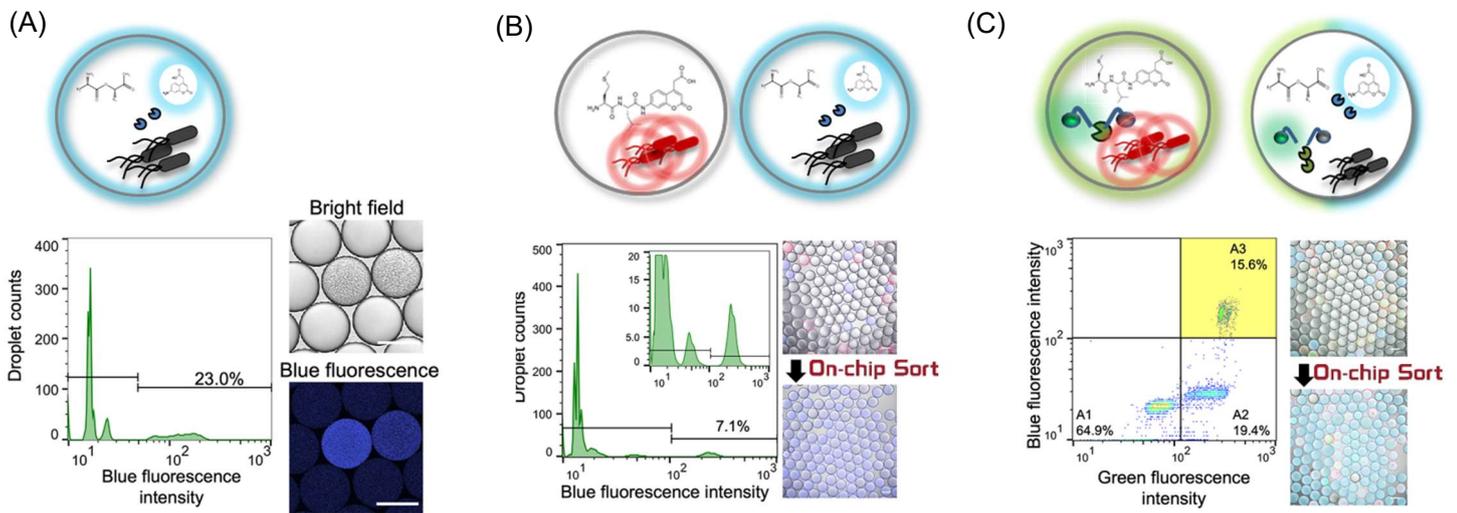


図2-2. 各種蛍光基質を用いた酵素高産生微生物のスクリーニングシステムの構築

(A) Dipeptidyl-ACAによる微生物由来DPPの検出 (B) Dipeptidyl-ACAとOn-chip® Sortを用いた酵素高産生微生物のスクリーニング (C) Dipeptidyl-ACAとFNAPによる酵素高産生微生物の検出とOn-chip® Sortによるスクリーニング

実際に豆腐店廃液中の微生物をサンプルとして、下記のフローでスクリーニングを行い (図2-3. A-C)、各スクリーニングステップでのサンプル中の微生物を16S rRNA遺伝子解析を行ったところ、Dipeptidyl-ACAを指標とした本スクリーニングシステムは、確かにDPPを産生する微生物を濃縮していることが確認できました (図2-3. D)。

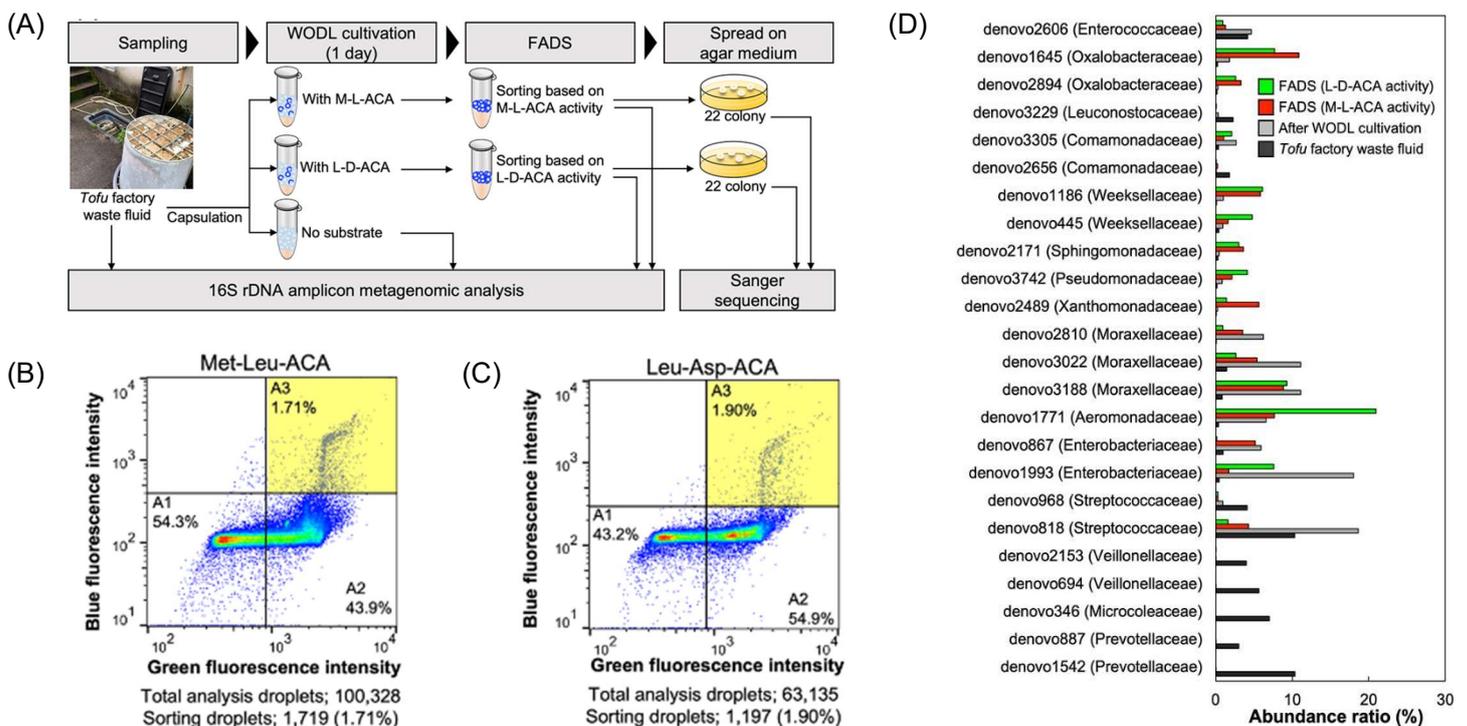


図2-3. ACAとFNAP-sort法を用いたハイスループットスクリーニングの実例

(A) 豆腐店廃液中に存在する微生物のDPP活性を指標としたハイスループットスクリーニングのワークフロー図 (B) Met-Leu-ACAと (C) Leu-Asp-ACAを基質とし、FNAP-sortを含むドロップレットをOn-chip® Sortで解析したプロット図とソーティングゲート(A3-黄色部分をソート) (D) 16S rRNA遺伝子に基づくメタゲノム解析とソート前後 (Leu-Asp-ACA; 緑, Met-Leu-ACA; 赤) のサンプル中における上位10個のOTUs存在比

親水性蛍光基質であるACAとWODLs、On-chip® Sortとの組み合わせにより、酵素産生微生物のハイスループットスクリーニングが可能となりました。本手法は様々な有用微生物の発見に大きく貢献していくものと予想されます。

Reference

7-Aminocoumarin-4-acetic Acid as a Fluorescent Probe for Detecting Bacterial Dipeptidyl Peptidase Activities in Water-in-Oil Droplets and in Bulk

Nakamura, A., Honma, N., Tanaka, Y., Suzuki, Y., Shida, Y., Tsuda, Y., Hidaka, K., Ogasawara, W.

Analytical Chemistry **2022** 94 (5), 2416-2424.

DOI: 10.1021/acs.analchem.1c04108. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.1c04108#>

長岡技術科学大学 技術科学イノベーション専攻
小笠原 渉 先生, Luu Xuan Chinh 先生

糸状菌は加水分解酵素や生理活性化合物、さらに組み換えタンパク質などを大量に分泌できることから、異種タンパク質生産の宿主として広く利用されています。その形質転換体構築にはプロトプラスト-PEG法が最も一般的であり、多くの研究者が活用しています。しかし、プロトプラストへ遺伝子導入後の寒天培地を用いた選別工程では、細胞壁回復による長期培養、再生効率の低さ、候補株の少なさなどの課題が存在します。そこで小笠原教授らのチームは、「ドロップレット培養」による選別方法を取り入れることで、寒天培地よりも再生効率が高く、かつ大量の糸状菌を短時間で形質転換する手法を考案されましたので紹介いたします。

初めに、*Trichoderma reesei* をモデルとして糸状菌のドロップレット培養の条件検討を行いました。形質転換には *cbh1* プロモーター駆動により GFP が発現する DNA フラグメントを使用しました。*cbh1* プロモーターは糖存在化で制御され、ドロップレット培養においてはソホース存在下で最も発現が誘導されることが分かりました。そこでソホース存在化で形質転換した *T. reesei* を培養した結果、培養12時間から菌糸の成長が見られ、18-24時間後には菌体内で GFP 由来の緑色蛍光が確認されました(図3-1)。また、培養24時間までは菌糸がドロップレット内部に保持されていましたが、36、48時間後には菌糸がオイル中に突き抜け、ドロップレット同士の融合が観察されました。

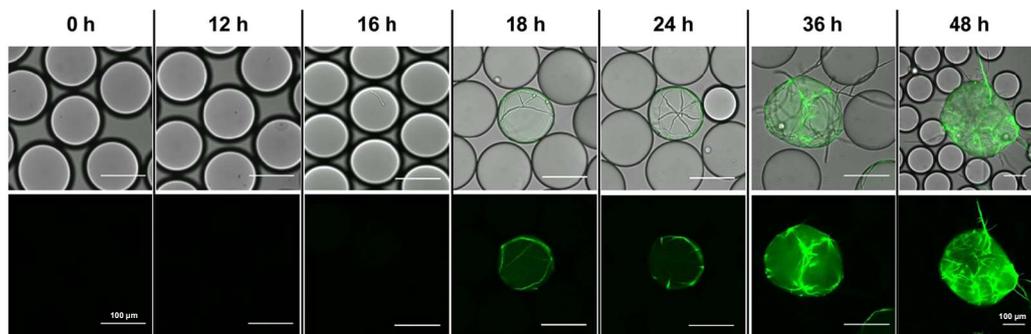


図3-1. GFP発現糸状菌のドロップレット培養 (上: 重ね合わせ, 下: 蛍光)

次にプロトプラストの再生率を従来の「寒天培地法」または「ドロップレット法」で比較しました。ドロップレット法では、プロトプラスト約100個をドロップレットに封入し、1,2,3日の各日数条件で回復培養した後、寒天培地でコロニーを形成することで再生率を計測しました(図3-2. A)。その結果、3日培養において31.62%の再生率を示し、これは寒天培地法と比較して8倍以上と非常に高い効率を示しました。この高い再生率の理由としては、1) トップアガー添加(プロトプラストの乾燥や浸透圧変動防止)による42-60°Cの高温処理が必要ないこと、2) ドロップレット培養環境におけるフッ素系オイルが寒天よりも酸素供給に優れていること、3) ドロップレットによる区画化がプロトプラスト同士の栄養競争を防ぐこと、などが挙げられます。

最後にドロップレット法を用いて、形質転換体のスクリーニング実証試験を行いました。DNAフラグメントを導入したプロトプラストをドロップレットで24時間培養した結果、一部のドロップレットにて形質転換に伴う GFP 蛍光が確認されました(図3-2. B)。そこで20万の候補株の中から蛍光が強い247ドロップレットをソーティングしました。得られた候補株を寒天培地に単離し、コロニーPCRで確認したところ、得られた候補株の96.6%において遺伝子カセットの増幅が確認されました。

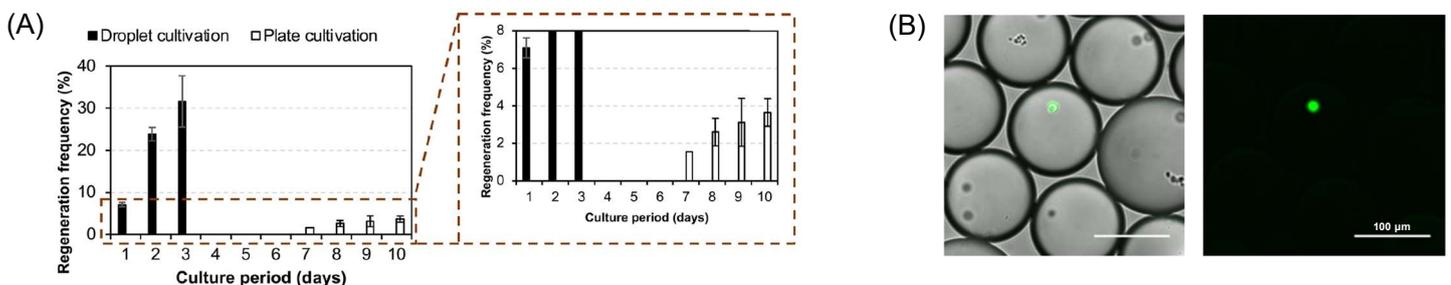


図3-2. ドロップレット法を用いたプロトプラストの培養

(A) ドロップレット法と寒天培地法におけるプロトプラストの再生率 (B) 形質転換をしたプロトプラストの24時間培養後の顕微鏡写真 (左: 重ね合わせ, 右: 蛍光)

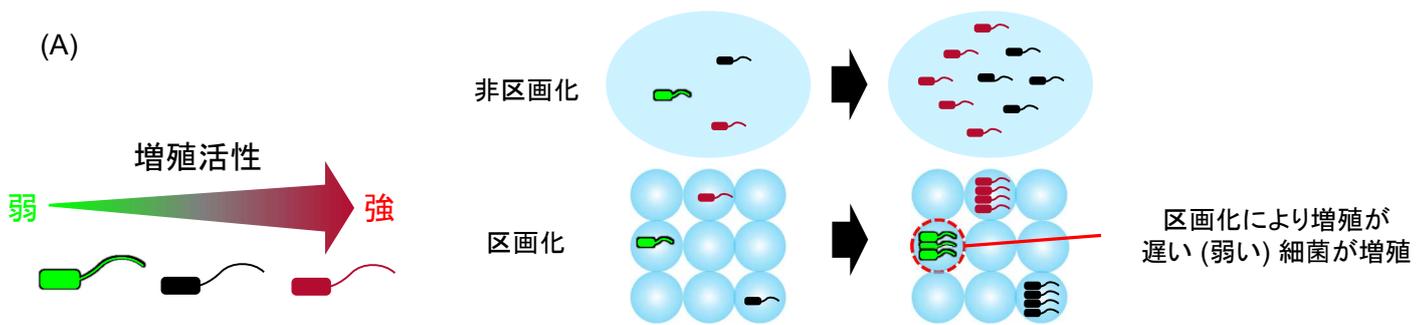
Reference

A novel high-throughput approach for transforming filamentous fungi employing a droplet-based microfluidic platform
Luu, X. C., Shida, Y., Suzuki, Y., Sato, N., Nakamura, A., Ogasawara, W.
New Biotechnology 2022 72, 149-158.
DOI: 10.1016/j.nbt.2022.11.003 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.11.003>

土壌や水圏、極限環境など地球上には様々な微生物が生息しており、その数は 10^{30} 細胞を超えられています。これら微生物の生態や代謝物などの機能を調べるためには、複合微生物集団から1種類ずつ分離培養することが必須であり、1870年にロベルト・コッホにより確立された寒天平板法は現代においても最も一般的な方法として利用されています。しかしながら、寒天平板法では多様な微生物種が同一培養空間に存在する環境を作りだし、増殖活性の強い種が優先的に増殖し、弱い種は淘汰されてしまいます(図4-1. A 非区画化)。そこで、2000年代以降、培養空間を微小に区画化するドロップレット技術が注目されており、大量の異種微生物が1種類ずつ物理的に分離された状態で培養することを容易にしました(図A 区画化)。このような培養空間の区画化は実際の培養においてどのような効果をもたらすのでしょうか？

培養空間の区画化の効果を調べるために、バルク液体(mLオーダー、非区画化)とドロップレット(pLオーダー、区画化)、それぞれの手法で土壌微生物を培養し、7日後における菌叢を16S rRNA遺伝子解析により比較しました(図4-1. B)。バルク液体培養後にはProteobacteria門に属する微生物が優占化しており、土壌と比較して多様性が格段に下がっていました。一方でドロップレット培養後の菌叢はバルク液体培養後よりも高い多様性を保ち、土壌の多様性を比較的保持していました。以上の結果から、区画化により、高い多様性を保ったまま複合微生物集団を培養できることが示されました。これは区画化による競合の緩和によって増殖活性の弱い微生物が淘汰されずに生育できたことが反映されていると予想されます。

本結果では培養後のドロップレットをまとめて菌叢解析していますが、今後、ドロップレットを一つずつ分離する技術を組み合わせることで、単離株の獲得およびその解析への応用が期待されます。



(B) 16S rRNA遺伝子配列に基づく菌叢解析

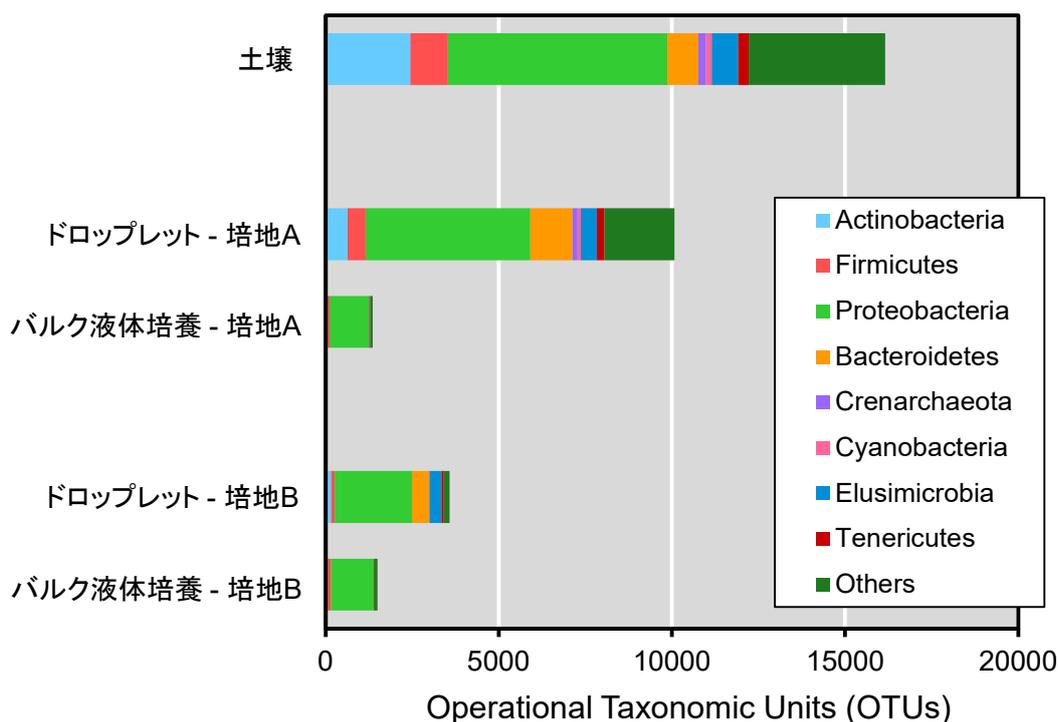


図4-1. ドロップレットを用いた培養と液体培養の比較

(A) 培養空間の区画化と非区画化の模式図 (B) 各種培養後の菌叢解析

理化学研究所 バイオリソース研究センター
市橋泰範 先生, 成川恵 先生

急激な人口増加に伴う地球環境問題への取り組みとして、農業や化学肥料を減らす低環境負荷型農業が注目されています。その中の一つとして、病原菌への拮抗作用を持つ微生物(拮抗微生物)を用いた生物農薬が注目され、近年開発が進んでいますが、適用病害種が狭いこと、圃場での定着性が低いこと、品質の安定性に欠けるなどの問題点がありました。これらを克服するためにはより多様な拮抗微生物株のスクリーニングが必要ですが、一連の作業に膨大な量の実験資材やスペース、多大な時間および労力を要することがネックとなっていました。

理化学研究所バイオリソース研究センターの市橋先生・成川先生らは、病原菌を蛍光標識することで、病原菌と拮抗微生物をドロプレット内で共培養したときの拮抗作用を「蛍光の減衰」として可視化できる技術を開発しました。この技術はOn-chip® Droplet GeneratorやOn-chip® Droplet Selectorが核となっており、従来法と比べ有用微生物スクリーニングにかかる大幅な時間や労力、実験材料やスペースの省コスト化に成功しております(図5-1)。

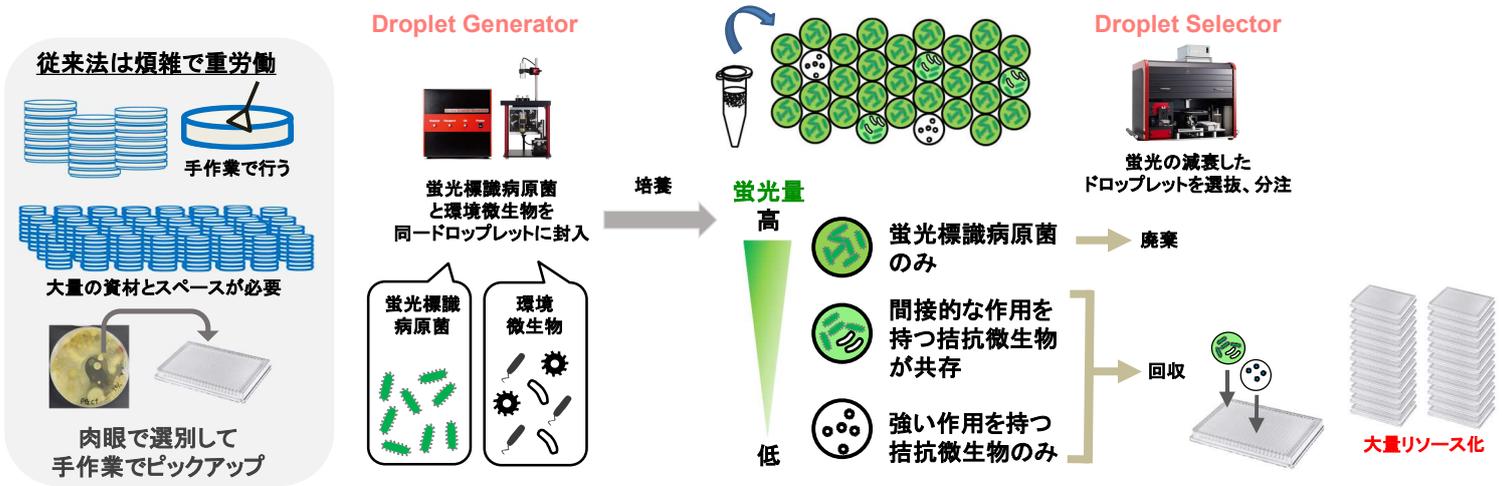


図5-1. ドロプレット技術を用いた拮抗微生物スクリーニング法のワークフロー

従来のドロプレット技術を用いた微生物スクリーニングでは、ドロプレット内の微生物数が0~1となるまで微生物懸濁液を希釈する工程を含みますが、空のドロプレットが多数生じることがスループット性を低くしておりました。本技術では、ドロプレット内に空ドロプレットが生じないように複数の病原菌及びスクリーニング源の微生物を封入することで、単一波長での蛍光検出を可能にし、スループット性を飛躍的に向上させました。また、本技術により、単一では培養できず共生することで培養が可能になるような微生物のスクリーニングも行えるようになりました。

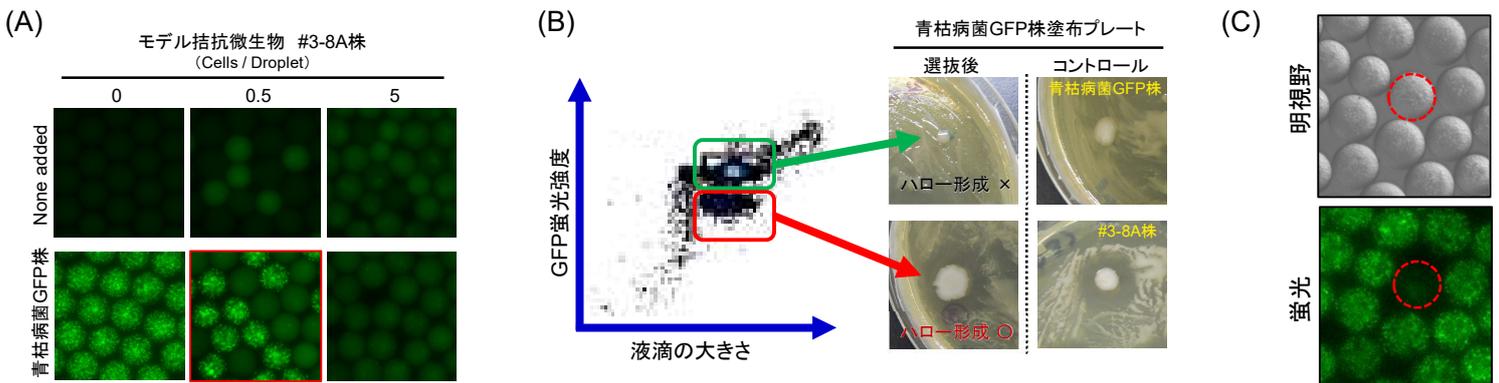


図5-2. 青枯病菌GFP標識株を用いた拮抗微生物スクリーニング

(A) 青枯病菌GFP標識株とモデル拮抗微生物#3-8A株を含むドロプレットの培養後の蛍光顕微鏡写真 (B) 0.5 cells/DropletのサンプルをOn-chip® Droplet Selectorで解析した二次元プロット図ならびに各集団を選抜し対峙培養した写真 (C) 青枯病菌GFP標識株と土壌微生物を共封入したドロプレットの培養後の蛍光顕微鏡写真

植物病原菌である青枯病菌のGFP標識株とそのモデル拮抗微生物#3-8A株を用いた実験により、ドロプレットの蛍光強度と拮抗作用に相関があることがわかりました(図5-2. A, B)。そこで、実際に青枯病菌GFP株と土壌微生物を共封入し培養すると、一部のドロプレットにおいてGFP蛍光強度の著しい減衰が確認でき、拮抗微生物の検出・単離が可能であることが示唆されました(図5-2. C)。

従来法と比較して共培養実験を迅速かつ大規模に実施できる本技術は、拮抗微生物のみならず、様々な有用微生物のスクリーニングを可能とし、バイオものづくりにおける革新的な手法となることが期待できます。

拮抗微生物
の大規模開発
基盤構築



発明の名称: 有用微生物のスクリーニング方法
出願番号(国際出願番号): PCT/JP2023/16681
出願日: 2023年04月27日

長岡技術科学大学 生物機能工学専攻
小笠原 渉 先生, 田中裕真 先生

日本における油脂の自給率は低く、安定した供給源が求められています。油脂の産生能が高い微生物の一種として油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* が知られていますが、本微生物を安定した供給源として使用するためには野生株のままでは不十分であり、その油脂産生能が改善した変異株を探索する必要があります。油脂高産生株のスクリーニングには、セルソーターを用いて1細胞ごとに細胞サイズと細胞内に蓄積された油脂量の評価する方法が一般的ですが、本手法ではソーティング時のダメージによる細胞死が問題となります。そこで、小笠原先生らはGMDを用いることで、選別後の株を生きのまま回収することに成功しただけでなく、選別時に増殖能と油脂産生能を同時に評価する画期的な方法を確立しました。

まず、油脂酵母 *L. starkeyi* をGMDに封入して培養しました。個々のGMD内でよく増殖する様子が観察され、培養後に油脂を選択的に染色するBODIPY色素を添加することで *L. starkeyi* 内で産生された油脂を蛍光検出できました(図6-1. A)。次に、On-chip® Sort を用いて *L. starkeyi* 変異株を培養したGMDを解析することで、増殖能と油脂産生能を同時に評価し、増殖が遅くかつ油脂産生能の高い株を含むGMDを選択的に回収しました(図6-1. B)。最後に、ソーティングしたGMDから獲得した株について、プレート上で増殖能および油脂産生能の評価を行ったところ、野生株の10分の1の増殖速度にもかかわらず、野生株と同等に油脂産生能の高い株が獲得されました(図6-1. C)。この特徴は産業的に非常に有用なもので、本手法が実際の産業応用に繋がるような有用株のスクリーニングに有効であると実証するものです。

増殖とその代謝物を同時に評価できる本手法は油脂酵母に限らず、バイオプロセスで利用される様々な微生物のスクリーニングへと応用されることが期待されます。

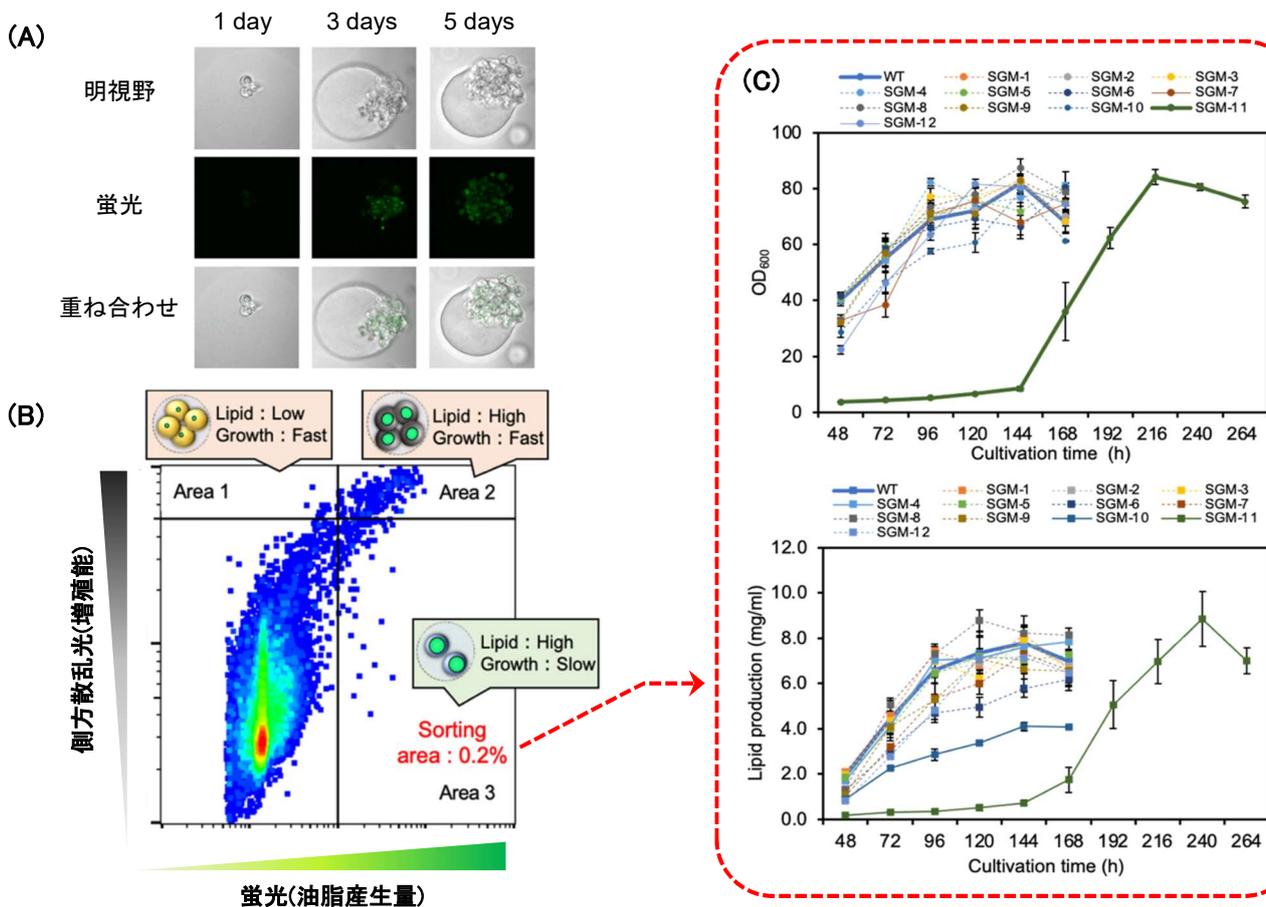


図6-1. GMDを用いた油脂酵母のスクリーニング

(A) 油脂酵母を培養したGMDの顕微鏡観察 (B) 油脂酵母の増殖能と油脂産生能を指標としたGMDの解析とソーティングゲートの設定 (C) ソーティングしたGMDから回収した株の増殖能および油脂産生能の評価

Reference

Using gel microdroplets to develop a simple high-throughput screening platform for oleaginous microorganisms

Tanaka, Y., Nakamura, A., Suzuki, Y., Maruta, K., Shida, Y., Ogasawara, W.

Journal of Biotechnology 2022 358, 46-54.

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.08.016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.016>

On-chip® Sortを用いた腸内細菌のハイスループットスクリーニングの可能性

嫌気チャンバー内で操作可能なOn-chip®製品

慶應義塾大学 先端生命科学研究所
福田真嗣 先生

腸内細菌とその代謝物質は、その住処である腸のみならず全身に作用することで、生理機能の恒常性維持や疾患発症に関与することが明らかとなっています。その知見は有用/有害な代謝物質を産生する腸内細菌の同定や、腸内細菌叢移植等に活用されています。しかし、腸内細菌のほとんどは嫌気性菌であることから、研究には嫌気チャンバーによる嫌気環境の構築が必要であり、その限定されたスペースでは多量のサンプルを取り扱うシングルセル化や大規模スクリーニングが難しいのが現状です。

On-chip® Droplet GeneratorによるGMDへの細菌の封入は、少ないスペースでの大量のシングルセル培養を実現します。GMDの中で増殖した細菌は各種蛍光試薬での染色も可能で、染色したGMD一つ一つはOn-chip® Sortで解析とスクリーニングが可能です。さらに、On-chip® SPiSと組み合わせれば迅速なプレート分注も可能です(図7-1. A-C)。これらの装置はすべて嫌気チャンバー内に設置することができるサイズであり、嫌気性菌のスクリーニングに最適です。実際に、偏性嫌気性菌であるビフィズス菌を腸内細菌のモデルとして用い、嫌気チャンバー内で一連の操作を行ったところ(図7-2. A, B)、GMDによるシングルセル化と培養、蛍光染色とソーティング、ソート後サンプルのプレートへの分注が嫌気状態でも問題なく行えることが確認できました。また、分注後のプレートの顕微鏡観察の結果から、GMDに封入したビフィズス菌の再培養が可能であることも確認できました。

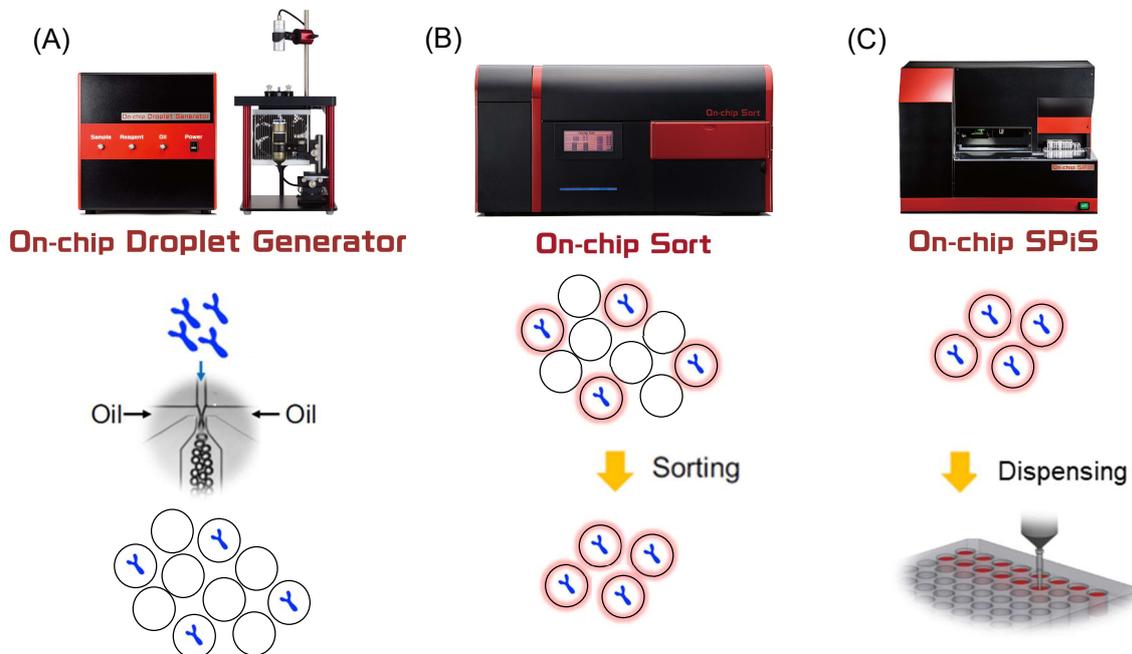


図7-1. On-chip® Sortを用いたGMDによるビフィズス菌のハイスループットスクリーニングのワークフロー

(A) On-chip® Droplet Generatorによるビフィズス菌のシングルセル化とGMDへの封入 (B) GMD内の蛍光染色とOn-chip® Sortによるソーティング (C) On-chip® SPiSによるソーティングしたGMDのシングルセル(GMD)分注

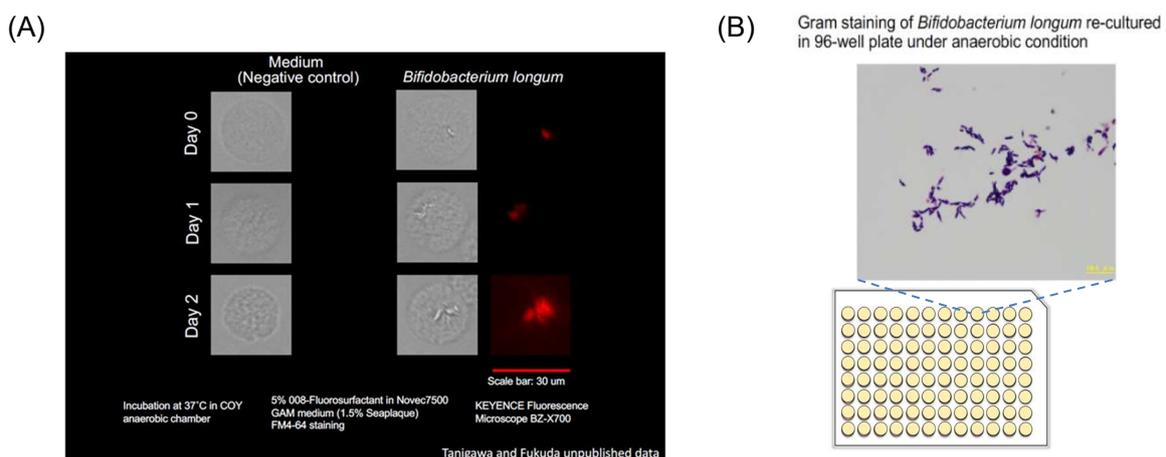


図7-2. ビフィズス菌のGMD封入・培養後の染色性とソーティング・プレート分注後の再培養

(A) GMD封入後0日目、1日目、2日目の顕微鏡像 (B) 2日間培養後にFM4-64染色陽性のGMDをOn-chip® SortおよびOn-chip® SPiSを使用して96穴プレートに分注し、再培養後の顕微鏡画像

近年、有用な酵素やバイオ医薬品としての抗体など、産業利用できる有用タンパク質の需要は高まっています。その生産方法として、遺伝子組み換えや大量培養が容易な酵母や大腸菌などの微生物が利用されていますが、工業レベルで目的のタンパク質を生産させるためには微生物スクリーニングが必須です。しかし、一般的に用いられている限界希釈法とタンパク質定量法を組み合わせたスクリーニング方法は、低スループットであり実用化までに長い時間がかかることが課題となっています。一方、セルソーターを用いたスクリーニングは高スループットに実施できるものの、細胞から分泌された物質を検出できないこと、加えてソーティングによる細胞へのダメージが大きいため有用タンパク質の生産を目的とした微生物スクリーニングには不向きです。金沢工業大学の町田先生らは、GMDを用いることで、微生物が分泌するタンパク質を蛍光検出できること、そしてそのタンパク質高産生微生物を生きたまま回収できることを示しました。実際に、出芽酵母をモデルとしてスクリーニングの実証実験を行い、タンパク質高産生株の獲得に成功しています。

まず、ルシフェラーゼ遺伝子の下流にHaloタグを連結したプラスミドを導入した出芽酵母に対し、UV照射によりランダムな遺伝子変異を引き起こすことで変異株ライブラリを作製しました。次に本ライブラリをGMDに封入し、一晚培養することでコロニーを形成させました。変異株から分泌されたGMD内の標的タンパク質はHalo Tag Alexa Fluor 488リガンドを加えることで蛍光染色しました。その後On-chip® Sortを用い、488 nmの波長を検出できるFL2チャンネルでHaloタンパク質の量を蛍光強度に変換して解析、その強度に基づいて3つのソーティングゲートを設定した後、各エリアに含まれるGMDをソーティングしました(図8-1. A)。各ソーティングゲートから得られたサンプルを顕微鏡下で観察したところ、P7エリアのGMDには生細胞は含まれず、強い蛍光の要因として死細胞あるいは蛍光色素の凝集が観察されました(図8-1. B 上段)。一方、P8エリアのGMDには強い蛍光を示し、かつ増殖が正常である細胞集団が観察されました(図8-1. B 下段)。さらにP9エリアのGMD内にはP8エリアよりも弱い蛍光を示すコロニーが観察されました(data not shown)。以上を踏まえて、強い蛍光を示し、かつ増殖が正常である細胞集団が観察されたGMDを含むP8エリアを高産生細胞として再度ソーティングしました。本手法で得られた変異株が本当に目的のタンパク質を高産生しているかを確認するため、プレート上でルシフェラーゼアッセイを実施したところ、変異導入前の株と比較して、2倍～5倍の高いタンパク質産生を示すP8-7株、P8-12株を得ることができました。(図8-1. C)。

本手法は有用タンパク質を産生する細胞株を効率的にスクリーニングできる手法として、様々なバイオテクノロジー産業での利用が期待されます。

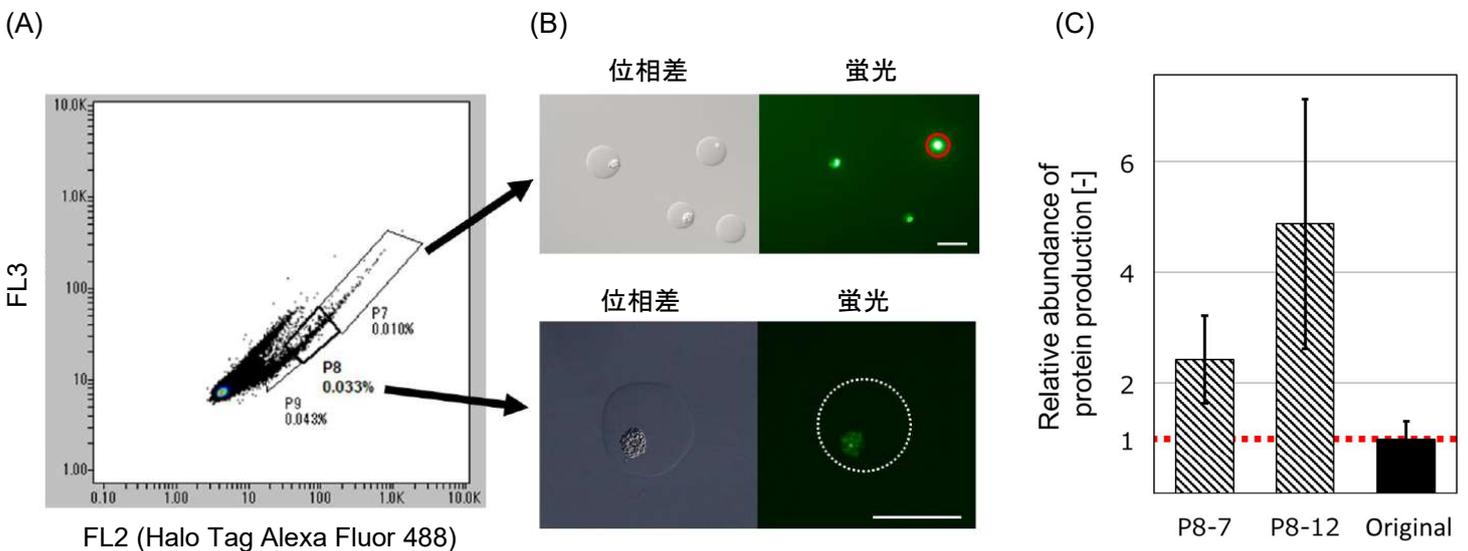


図8-1. ゲルマイクロドロップを用いたタンパク質高産生株のスクリーニング

(A) 変異株を培養したゲルマイクロドロップの蛍光検出 (B) P7、P8エリアのゲルマイクロドロップの顕微鏡観察図 (C) ソーティングされた株のタンパク質産生量

Reference

High-throughput screening of high protein producer budding yeast using gel microdroplet technology

Fujitani, H., Tsuda, S., Ishii, T., Machida, M.

bioRxiv 2019

<https://doi.org/10.1101/830596>

Nanovialを用いた抗体産生細胞の ハイスループットシングルセルスクリーニングの実例

カリフォルニア大学カリフォルニア校 バイオエンジニアリング分野
Joseph de Rutte 先生, Dino Di Carlo 先生

表面抗原を指標としたセルソーティングとシングルセル解析は、現代の細胞生物学にとって欠かすことのできない重要なツールと言えます。一方、サイトカインや抗体の分泌をはじめとした細胞機能を指標とした解析を行うためには、細胞内染色が必要であり、細胞を生かした状態でのソーティングは難しいものでした。カリフォルニア大学のJoseph de Rutte博士とDino Di Carlo教授らのグループは、Nanovial内部でシングルセルを培養し、分泌物をその内部に留めることで、細胞内染色を必要としない分泌物解析とセルソーティングを実現しました。本製品は、Partillion Bioscience Corporationから販売されています。

Nanovialは中心に球状の内腔のあるマイクロビーズで、抗体を含む様々な担体で修飾することにより内腔に細胞を留めることが可能です。また、エマルジョン状態でNanovialを油中に封入し培養することで、細胞からの分泌物が拡散することを防ぎ、内腔に結合させた抗体で目的の分泌物を捉えます。この内腔に留まった分泌物に対して蛍光標識抗体による染色を行うことで、目的の分泌物とそれを分泌する細胞を標識、フローサイトメーターでの検出とソーティングを可能にしています。Nanovialのサイズは35 μm から85 μm と目的の細胞サイズに合わせて選択できますが、既存のセルソーターでは対応できないサイズも含まれています。Joseph博士らのグループはマイクロ流路型セルソーターであるOn-chip[®] Sortを用いることで、様々な細胞で分泌物を指標としたソーティングが可能であることを示しています(図9-1. A)。

細胞療法や抗体医薬品などの生物製剤のさらなる発展には、細胞からの分泌物を指標としたシングルセル解析とスクリーニングが必須です。様々な修飾が可能で応用性が広く、また既存のセルソーターで運用できるNanovialは、そのニーズに応える強力なツールになると考えられます。

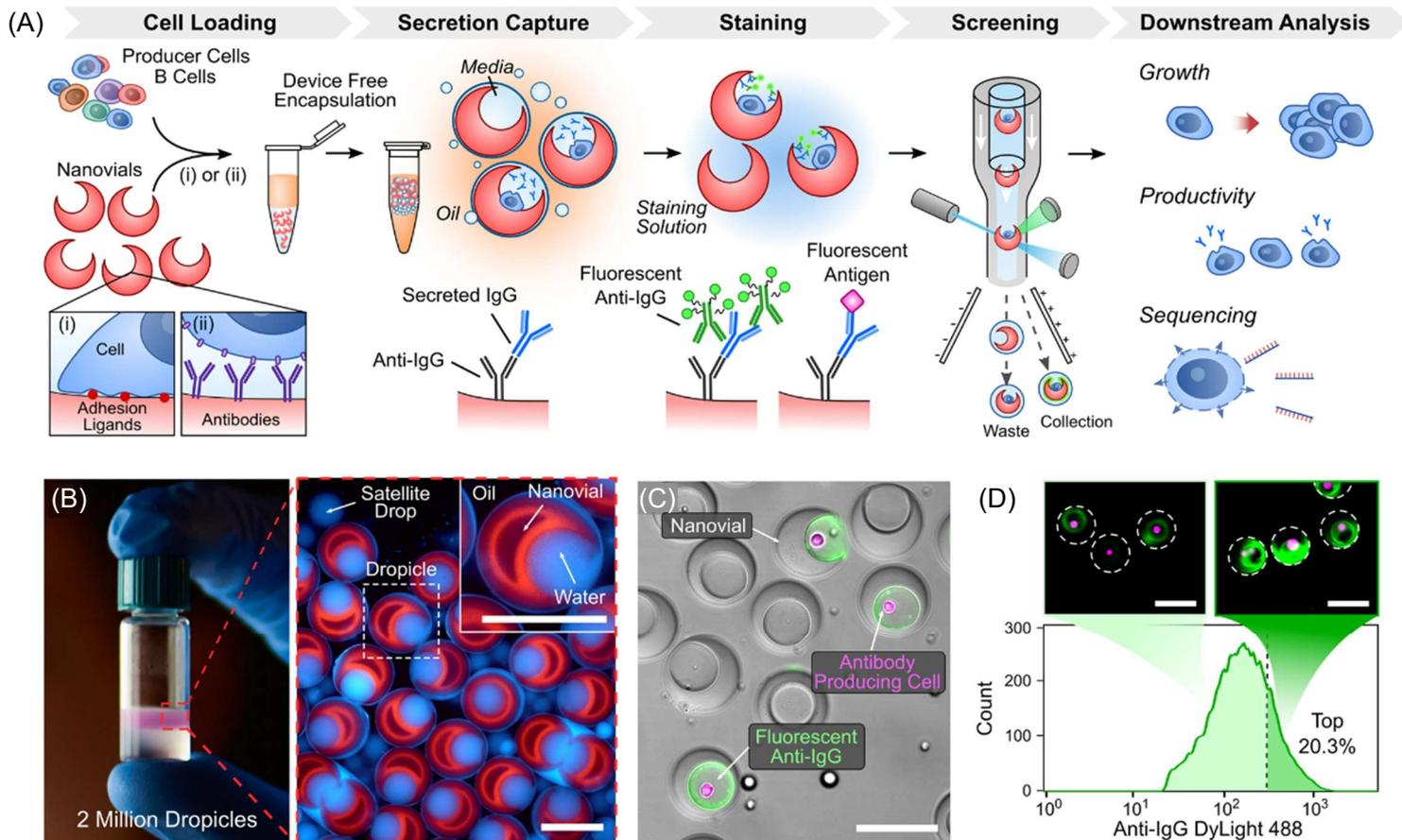


図9-1. Nanovialを用いた細胞からの分泌物を指標とするハイスループットスクリーニング法

(A) Nanovialを用いた抗体産生細胞スクリーニングのワークフロー図 (B) 油中水滴型エマルジョンにしたNanovialとその拡大図 (C) 油中で培養し、抗体を産生させた後にオイル除去、蛍光染色を施したNanovialの蛍光顕微鏡図 (D) フローサイトメーターでのプロット図と各フラクションのソート後の蛍光顕微鏡写真

培地に懸濁したNanovialは、オイルを加えてピペッティング操作を行うことで容易にエマルジョン化します(図9-1. B)。内腔に細胞と培地を保持したエマルジョンはそのまま培養が可能であり、オイルに阻まれたNanovial間での干渉は起こりません。また、オイルからの回収も容易であるため、その後の蛍光染色やフローサイトメーターでの解析も可能です(図9-1. C, D)。つまり、Nanovialは“ウェル毎にフローサイトメーターでの解析とソーティングが可能なELISAプレート”という特徴を持つツールと言えます。

Nanovialはサイトカイン等の分泌物のみならず、抗原特異的な抗体とその産生細胞をスクリーニングすることもできます。抗卵白リゾチーム抗体を産生するハイブリドーマ、HyHEL-5を用いた検討では、分泌された抗体を抗Fc抗体でNanovial内腔に留め、蛍光標識した卵白リゾチームを反応させることで目的の抗体を産生するハイブリドーマのみをスクリーニングできることが確認されています(図9-2. A, B)。事実、非ターゲットである抗Myc-Tag抗体産生ハイブリドーマを含む100万個の母集団に0.18%しか含まれなかったHyHEL-5を90%の純度でソーティングすることに成功しています(図9-2. C)。また、ソーティングした細胞は、RT-PCRによる抗体遺伝子の増幅、拡大培養がそれぞれ可能であることも確認できています(図9-2. D)。

この方法を応用することで、免疫したマウスから目的の抗体を産生するB細胞をソーティングすることが可能です。実際にオボアルブミン(OVA)を免疫したマウスのB細胞をNanovialと蛍光OVAを組み合わせて解析、ソーティングしたところ、細胞表面のみに強いシグナルがあるもの、細胞表面にシグナルは無いがNanovialから強いシグナルを発するもの等、様々な陽性Nanovialが含まれていました。これは既存のB細胞受容体と抗原の結合を利用した抗原特異的なB細胞スクリーニングで得られていた未熟B細胞に加え、より分化したプラズマ細胞も同時に検出できていることを強く示唆しています(図9-2. E)。

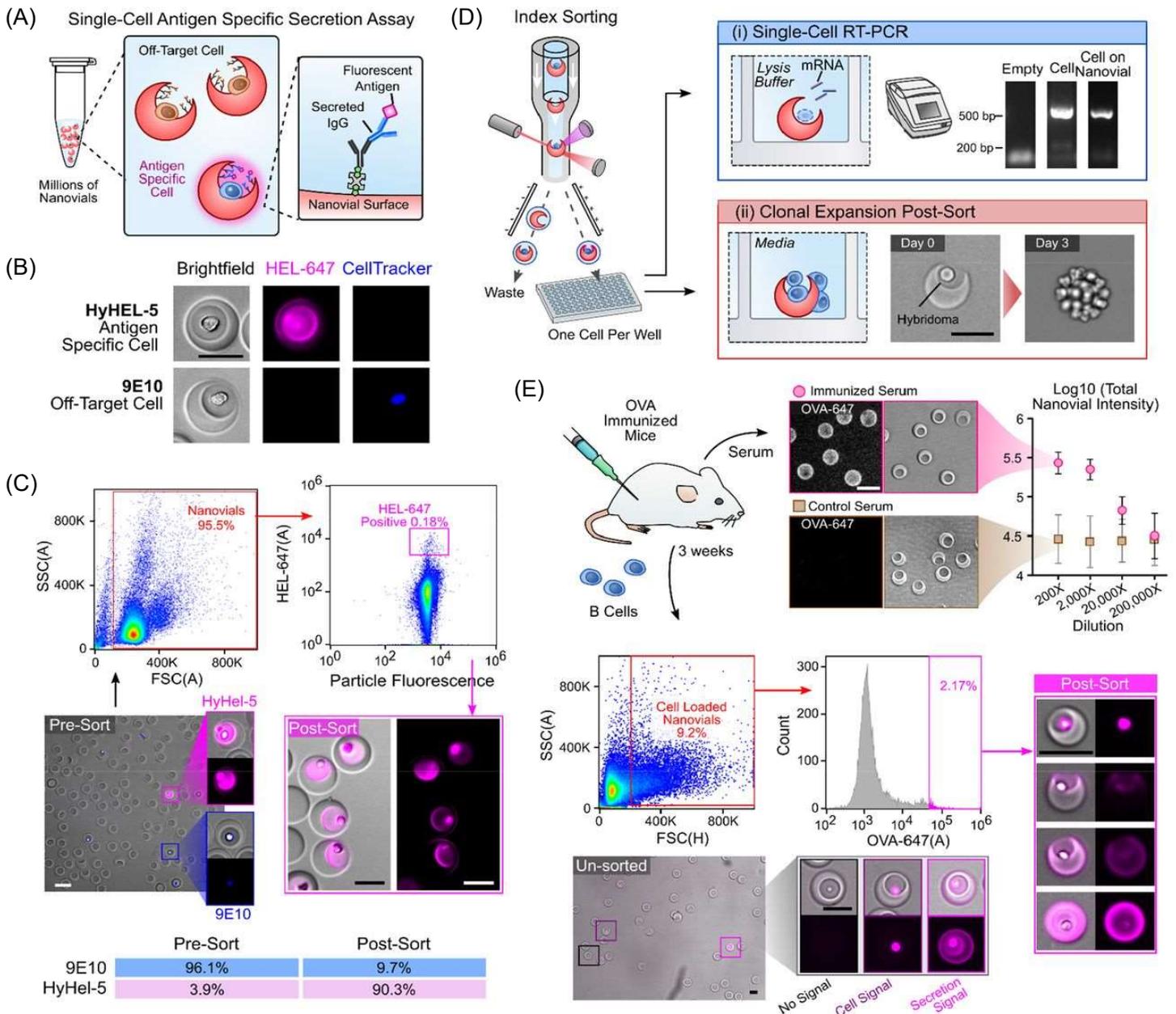


図9-2. Nanovialを用いた抗原特異的な抗体産生細胞のスクリーニング

(A) 蛍光抗原を用いた抗原特異的な抗体産生細胞スクリーニングの模式図 (B-D) HyHEL-5と蛍光標識抗原をモデルとした目的の抗体を産生する細胞の検出 (C) ならびに解析、ソーティング結果と (D) RT-PCRによる抗体遺伝子の増幅、拡大培養の実例 (E) OVA免疫マウスにおける血清中の抗OVA抗体の検出と抗OVA産生B細胞のスクリーニング

Reference

Suspending Hydrogel Nanovials for Massively Parallel Single-Cell Functional Analysis and Sorting

Joseph de Rutte, Dino Di Carlo. *et al.*

ACS Nano **2022**, *16*, (5), 7242–7257.

DOI: 10.1021/acsnano.1c11420. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c11420>



株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

〒184-0012 東京都小金井市中町2丁目16-17

デモ、見積もり、技術に関するお問い合わせはこちら

- ✉ info@on-chip.co.jp
- ☎ 042-385-0461
- 🌐 <https://on-chip.co.jp/>

🔍 Home Page

