

Application Note

新規親水性蛍光プローブACAによる油中水滴型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)

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., Hidaka, K., Ogasawara, W. et al. *Analytical Chemistry* 2022 94 (5), 2416-2424.

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

Introduction

油中水滴型ドロップレット(Water-in-Oil droplets; WODLs)は、油相中に分散したpL-nLスケールの微小な水滴であり、内部に動物細胞や微生物を封入することでサンプル間の干渉を抑えた培養とシングルセル解析が可能です。また、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っ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、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、世界で唯一、WODLsを直接SortingできるOn-chip® Sortと組み合わせることで、汎用性の高いハイスループットスクリーニングシステムを構築しました。

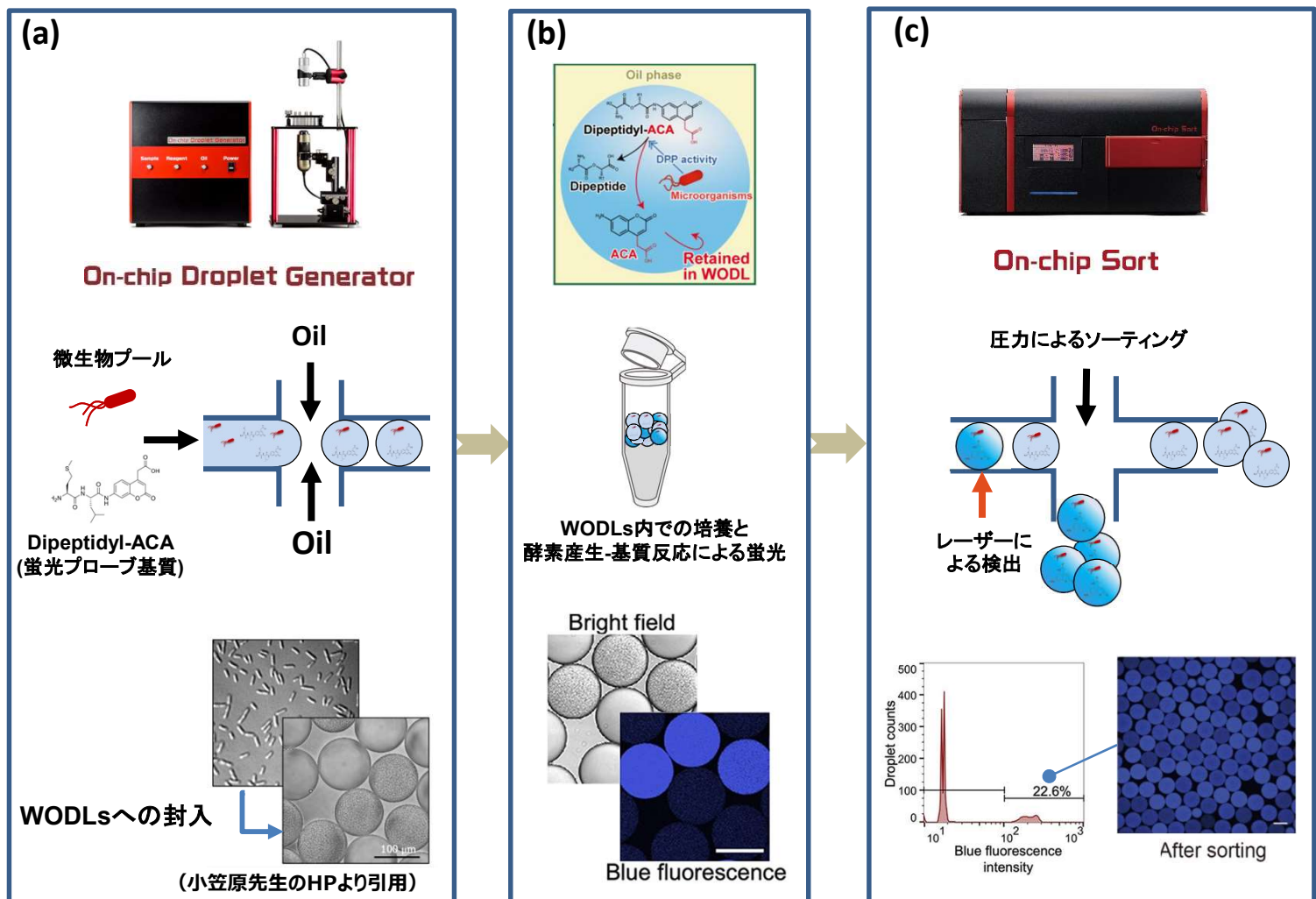


図1. On-chip® Droplet generator, Dipeptidyl-ACA, On-chip® Sortを用いた酵素産生微生物スクリーニングのワークフロー (a) On-chip® Droplet generatorによるDipeptidyl-ACAと微生物を含むWODLsの生成 (b)WODLs内部での微生物培養とDPP活性による蛍光強度の上昇 (c) On-chip® Sortによる蛍光シグナル陽性WODLsの検出とソーティングによる酵素高産生微生物の回収

Backgrounds and Results

WODLsでの酵素活性検出に向けた親水性基質の探索

7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) はクマリンの7位にアミノ基が結合した誘導体であり、強い青色蛍光を発します。AMCはこのアミノ基を反応基として様々なペプチドとアミド結合による連結が可能であり、その連結により蛍光が一時的に減衰します。しかし、アミド結合の加水分解や酵素反応によって遊離したAMCは再び強い蛍光を発することから、任意のペプチドとAMCを結合したものは様々な酵素活性を検出できる蛍光基質として広く利用されています。

一方でAMCは油相へと拡散してしまうためWODLs内での酵素活性の測定には適しておらず、その酵素活性を基準とした微生物スクリーニングへの応用は難しいものでした。そこでAMC誘導体で疎水性が低下したACAとペプチドを結合させた蛍光ペプチド基質を合成し、その可能性について検討しました。

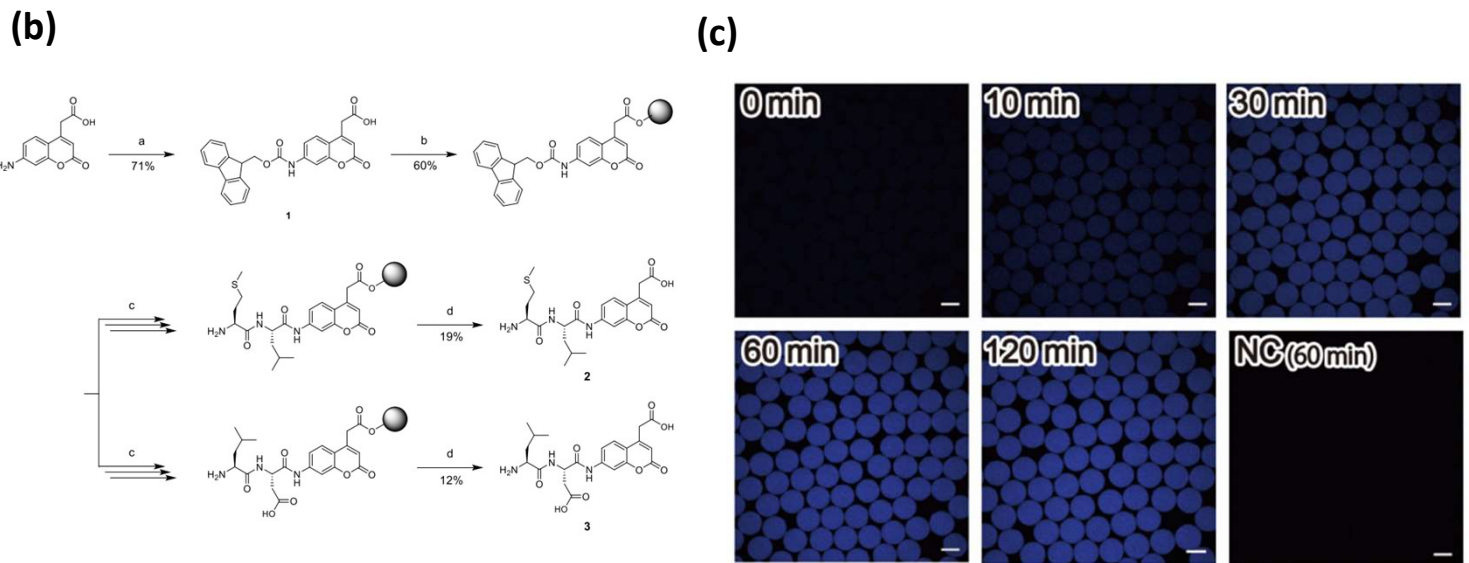
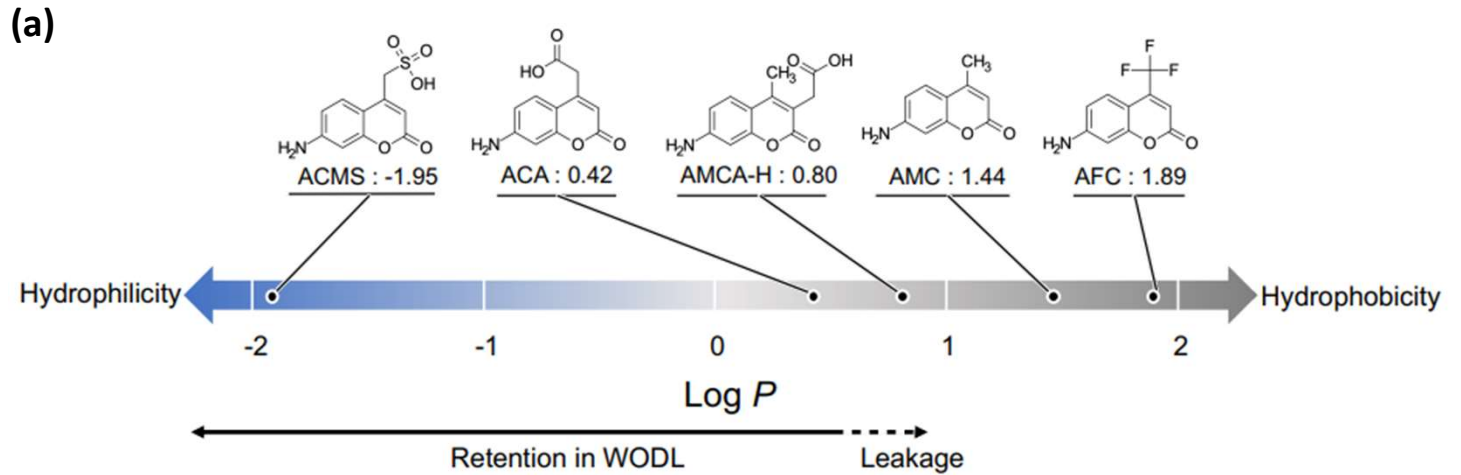


図2. ACAと他蛍光試薬の疎水性の比較とDipeptidyl-ACAの蛍光標識ペプチド基質としての機能評価

(a) 検討に用いた蛍光標識試薬の疎水性 (分配係数; Log P)とWODLs内部での残存性 (b) ACA結合型ジペプチド(Met-Leu-ACA, Leu-Asp-ACA)の合成手順 (c) WODLs内部でのMet-Leu-ACAとDPP反応によって生じた蛍光

最初にACAとAMC、その他3種類の蛍光標識試薬の疎水性とWODLs内部での残存性について確認しました。その結果、ACAは既存の蛍光試薬であるAMCと比べ疎水性が低く(図2. a)、168時間後においてもWODLsに残存することが確認されました。一方、同様に疎水性が低いACMSはWODLsに残存したものの酵素活性を阻害したため、ACAがより有望と判断し、2種類のジペプチドと結合させて基質としました(図2. b)。このDipeptidyl-ACAを精製酵素とともにWODLs内部に封入したところ、WODLs内部のDPP活性を検出することができました(図2. c)。

モデル微生物を用いた新規親水性蛍光プローブの性能試験

合成した二種類のDipeptidyl-ACAが微生物由来の酵素によって蛍光を発するか、またその蛍光シグナルを指標とした微生物スクリーニングが可能かどうかについて、DPPを産生するモデル微生物*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24を用いて以下の三つの項目に関して検討しました。

- (a) 微生物が産生する酵素を蛍光として検出し、その微生物を単離することができるか？
- (b) 複数の微生物から目的の酵素を産生する微生物のみを選択的に単離することができるか？
- (c) 酵素活性以外にも分裂速度などの有用な形質を同時に評価したい場合、他色素と組み合わせても精度よくスクリーニングを行えるか？

検討に際しては、On-chip® Droplet Generatorを用いてWODLs内部にモデル微生物とDipeptidyl-ACAを封入し、24時間培養後の蛍光シグナルをOn-chip® Sortで解析、目的分画のSortingを行っています。また、(c)の検討では弊社が販売するFNAP（下記QRコード参照）を用いて増殖に伴うRNaseの蓄積を緑色蛍光として検出し、微生物の増殖能を同時に評価しています。

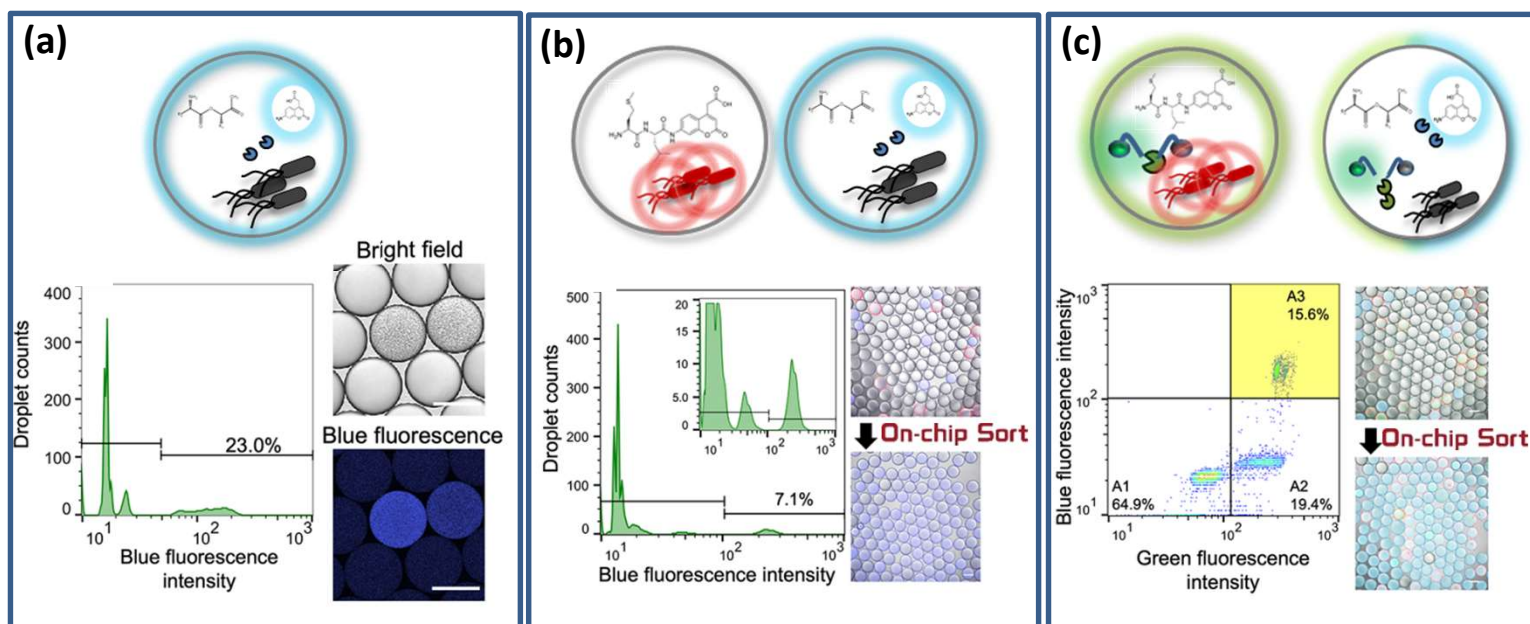


図3. On-chip® SortとFNAPを組み合わせた酵素高産生微生物のスクリーニングシステムの構築

- (a) Dipeptidyl-ACAによる微生物由来ジペプチダーゼの検出
- (b) Dipeptidyl-ACAとOn-chip® Sortを用いた標的微生物のスクリーニング
- (c) Dipeptidyl-ACAとFNAPによる高産生微生物の検出とOn-chip® Sortによるスクリーニング

Dipeptidyl-ACAによってWODLs内の*P. mexicana* WO24が産生するDPP活性を青色の蛍光として検出することができました（図3. a）。さらにOn-chip® Sortを用いたWODLsのソーティングを行うことにより、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や（図3. b）、FNAP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3. c）

このように、弊社の販売するFNAP試薬は単独で微生物の増殖を検出するだけでなく、様々なアプリケーションと併用することが可能です。



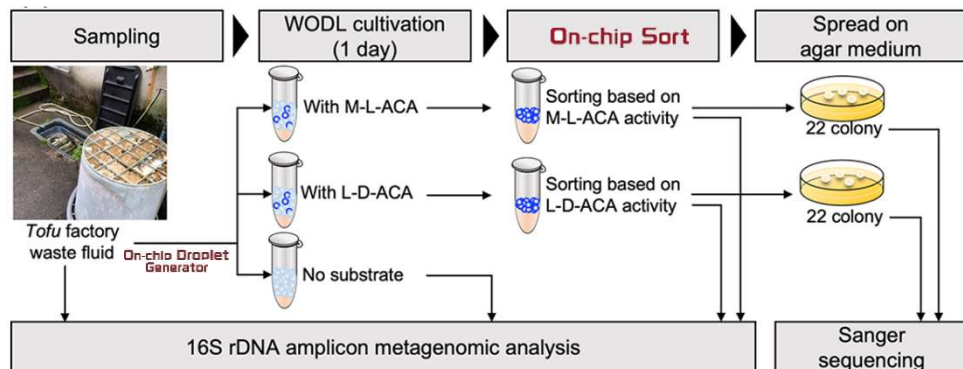
蛍光核酸プローブを用いた細菌を含むWODLsのソーティング (FNAP-sort法)

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, et al. (2019) PLOS ONE 14(4): e0214533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214533>

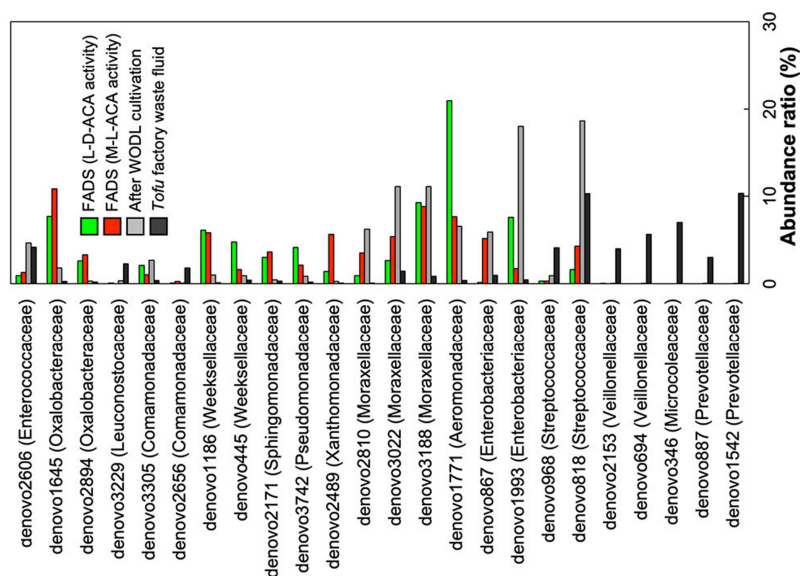
豆腐店廃液をサンプルとしたDipeptidyl-ACAによるスクリーニングの実例

環境微生物に対しても同様にスクリーニングが可能かどうかをペプチド成分が豊富な豆腐店の廃液サンプルをターゲットに検討しました。

(a)



(b)



(c)

Sample specificity	Determined strains using BLAST		
	No.	Identify (%)	
Common	1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> strain A1-18	99.7
	2	<i>Pseudogamella danionis</i> strain E3/2	98.2
	3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain c-p10	99.0
	4	<i>Chryseobacterium camelliae</i> strain THG C4-1	95.2
	5	<i>Flavobacterium chilense</i> strain LM-09-Fp	99.6
	6	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966	99.7
	7	<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	99.4
	8	<i>Falsarthrobacter (Arthrobacter) nasiphocae</i> strain M597/99/10	98.1
	9	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> strain NBRC 102515	99.4
	10	<i>Stenotrophomonas terrae</i> strain R-32768	99.0
M-L-ACA specific	11	<i>Lactococcus lactis</i> strain NBRC 100933	99.8
	12	<i>Pantoea agglomerans</i> strain DSM 3493	99.2
	13	<i>Klebsiella grimontii</i> strain SB73	99.0
	14	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. lausannensis strain ES15	99.6
	15	<i>Moraxella osloensis</i> strain DSM 6998	99.1
	16	<i>Pseudomonas ottidis</i> strain MCC10330	99.8
	17	<i>Brevundimonas faecalis</i> strain CS20.3	99.1
	18	<i>Massilia violacea</i> strain CAVIO	99.8
	19	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> strain CECT 4199	99.7
	20	<i>Pseudomonas protegens</i> strain CHA0	99.8
L-D-ACA specific	21	<i>Chryseobacterium gallinarum</i> strain 100	99.5
	22	<i>Paenarthrobacter nitrogujacolicus</i> strain G2-1	99.8
	23	<i>Chryseobacterium taihense</i> strain THMBM1	97.6
	24	<i>Flavobacterium ginsengiterrae</i> strain DCY55	96.4
	25	<i>Pararheinheimera arenilitoris</i> strain J-MS1	98.1
	26	<i>Chryseobacterium arachidis</i> strain 91A-593	98.5
	27	<i>Sphingomonas trueperi</i> strain NBRC 100456	99.9
	28	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040	98.9
	29	<i>Cloacibacterium haliotis</i> strain WB5	98.6
	30	<i>Brevundimonas terrae</i> strain KSL-145	99.4

図4. 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)16S rRNA アンプリコン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 (c) スクリーニングによって得られた微生物の16S rRNAシーケンス結果とBLASTによる菌株の同定

豆腐店廃液中の微生物をサンプルとして、上記のフローでスクリーニングを行い(図4. a)、各スクリーニングステップ毎でのサンプル中の微生物を16S rRNAアンプリコンメタゲノム解析を行うことで、本スクリーニングシステムが有用かどうかを確認しました。その結果、Dipeptidyl-ACAの蛍光を指標としたOn-chip® SortによるWODLsのソーティングは、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4. b)。 加えてソート後のサンプルを寒天培地に播種し、得られたコロニーに対し16S rRNAのシーケンス解析を行ったところ、同定された菌の多くがペプチダーゼを産生する菌株であることが確認されました (図4. c)。

本研究で開発したACA基質は、ペプチド部位を変更することで様々な酵素活性の評価が可能です。WODLs内での酵素活性評価とOn-chip® Sortとの組み合わせによる本スクリーニングシステムは、今後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。



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2-16-17

TEL: 042-385-0461 Email: info@on-chip.co.jp

URL: https://on-chip.co.jp/