

On-chip® Sortを用いたゲルマイクロドロップによる高生産性出芽酵母のハイスループットスクリーニング

Summary of Fujitani, H., *et al.* 2019. bioRxiv 830596; doi: <https://doi.org/10.1101/830596>

This application note was produced under the licence of Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Introduction

近年、酵素・機能性蛋白質・抗体などを含むタンパク質の生産に対する需要が高まっています。しかしながらこれまでのタンパク質生産方法は、様々な技術的課題に直面しています。例えば、生成時間が短い利点から微生物によるタンパク質製造法がよく用いられていますが、スクリーニングの方法によっては微生物集団の個々の微生物がタンパク質の発現量に不均一性を示すなど、工業的かつ効率的にタンパク質を製造することが難しいという問題があります。そのため、タンパク質高生産性株を選択することが重要になります。一般的に用いられている限界希釈法やタンパク質定量法は、手技として煩雑で低スループットであることが知られています。そのスループット改善のためフローサイトメーターを使用してタンパク質高生産性株を単離しますが、高増殖性を持つ株の識別まではできません。タンパク質生産効率を考える場合、株の増殖性の評価も重要なファクターとなります。これら問題の解決のためタンパク質高生産酵母と高増殖酵母の2つの特徴を併せ持つ酵母をハイスループットで選別するための新しいワークフローが開発されました。このワークフローでは、個々の酵母をアガロースを使用したゲルマイクロドロップ（GMD）に封入してコロニーを形成し、標的となるタンパク質を分泌させ、その後、蛍光で光らせ定量することにより、高生産性・高増殖性のクローンを分取・単離します。GMD内で酵母を培養しコロニーを形成させるため、そのGMDサイズは50~60 μ mを使用します。そのため、~120 μ mの塊までソーティングすることができるOn-chip® Sortを使用しました。本報告は、proof-of-conceptでしたが酵母に限らず微生物全般、細胞にも応用可能なタンパク質の生産効率を向上させた株の単離技術となる可能性があります。

Methods

A) 変異誘導した組換え出芽酵母を封入した油中水型ドロップレット生成とアガロースGMD化

B) HaloTagリガンドを用いたGMD内の酵母から分泌されるタンパク質の蛍光染色

C) On-chip® Sortにおける高生産・高増殖酵母を含むGMDのソーティングおよび寒天培地へ

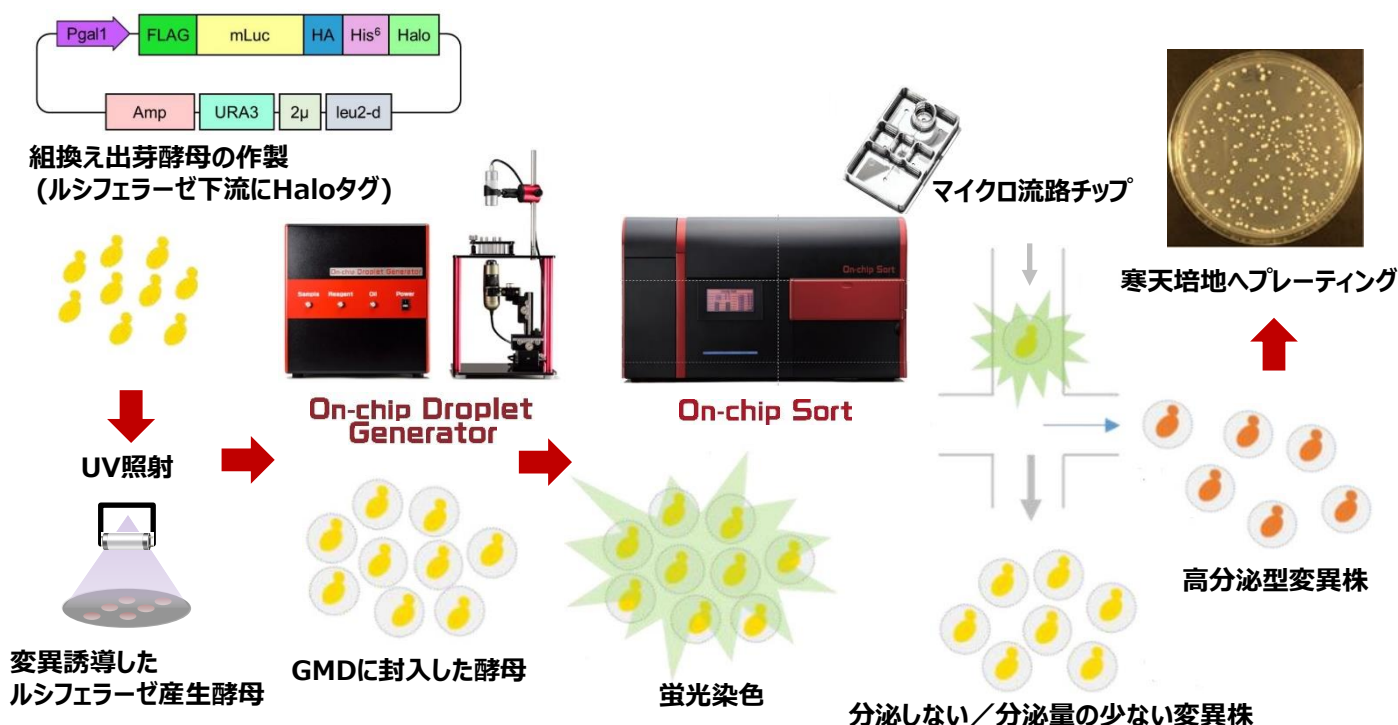


図 1. On-chip® Sortを用いたGMDによる高生産性酵母のハイスループットスクリーニングのワークフロー

Application Note

図1は、出芽酵母を封入したGMDソーティングによる高生産性・高増殖性株ハイスルーブットスクリーニングのワークフローを示しています。proof-of-conceptであるためルシフェラーゼ下流にHaLoタグが入ったプラスミドを出芽酵母に導入し、UV照射により変異誘導をする内容ですがプラスミド導入しない株への応用も可能と考えております。アガロースGMD中に発芽酵母をカプセル化するために、On-chip® Droplet Generatorで油中水型ドロプレットを生成しました(図1A)。酵母を含むドロプレットをGMD化し30℃で一晩培養してコロニーを形成させました。培養したGMDをHaloTag Alexa Fluor 488リガンド(Promega Corporation、米国)で30分間染色し、GMD内の酵母から分泌されるルシフェラーゼ-HaloTagを蛍光標識しました(図1B)。強い蛍光を有するGMD(すなわち、高分泌型UV変異誘導体)を、80µm流路幅マイクロ流体チップ(2Dチップ-Z101)とOn-chip® Sortを使用してソーティングしました(図1C)。ソーティングしたGMDは、コロニー形成のために寒天プレート上で培養し単離しました。単離したクローンは、ルシフェラーゼアッセイ(Clontech Laboratories, Inc, USA)するため、液体培養し上清を回収してサンプルとしました(図2)。

Results

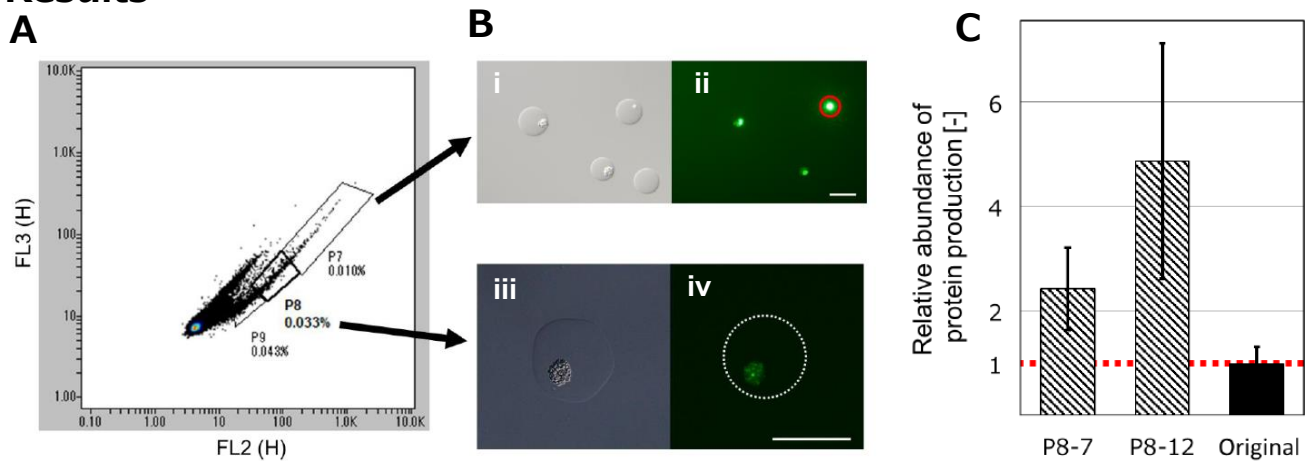


図2. A) On-chip® Sortによるソーティング。GMDの蛍光チャンネルFL2 (HaloTag-AF488)とFL3 (蛍光なし)の2次元プロットで展開したドットプロット。P7は擬陽性、P8は強蛍光GMD、P9は中～弱/なし蛍光GMD。目的であるP8をソーティング。B) ソーティングゲートP7およびP8でソーティングされたGMDの明視野顕微鏡写真 (i, iii) および緑色蛍光顕微鏡写真 (ii, iv)。(ii)において、赤丸は死細胞などの擬陽性を示す。(iv)点線は、GMD境界を示す。C) ソーティングゲートP8でソーティングした出芽酵母のルシフェラーゼアッセイ。エラーバーはn=3の標準偏差を示す。

HaloTag Alexa Fluor 488リガンドの蛍光チャンネルFL2 (検出波長~520 nm) を用いて、高分泌変異体を封入したGMDをOn-chip® Sortでソーティングしました(図2A)。FL2チャンネルの蛍光強度に基づいて、3つのソーティングゲートP7、P8、P9を作成しました。ソーティングゲートP7は強い蛍光強度を示すGMDが確認されました。しかしながらこれらGMDは死んだ酵母を多く含むか蛍光色素の凝集であることが顕微鏡観察から解り非ターゲットと設定しました (data not shown)。P8は図2 Bのiiiとivにあるとおり、強蛍光を示し増殖も正常であるためターゲットと設定しました。P9は、中～低/なし蛍光強度を示すコロニーが観察されました。P8からソーティング後寒天培地でコロニーを形成させた合計14個をピックアップし、原株(GMDへのカプセル化および選別なし)とともに、ルシフェラーゼアッセイで評価しました。原株と比較して、選別されたサンプルの約半数が高い産生活性を示しました。その中でもP8-7では2倍以上のルシフェラーゼ産生量の増加を示し、P8-12では5倍以上の産生量の増加を示しました(図2C)。このように、GMD技術とOn-chip® Sortを組み合わせることで、高生産性・高増殖性クローンの効率的な選択とタンパク質生産性の向上が可能となります。このワークフローは、高分泌型細胞のスクリーニングを酵母に限らず、細菌、麹菌、その他微生物および哺乳類細胞の単離にも有用であると考えられます。