

「漏れない基質」の開発による微生物 を用いたバイオものづくりへの貢献

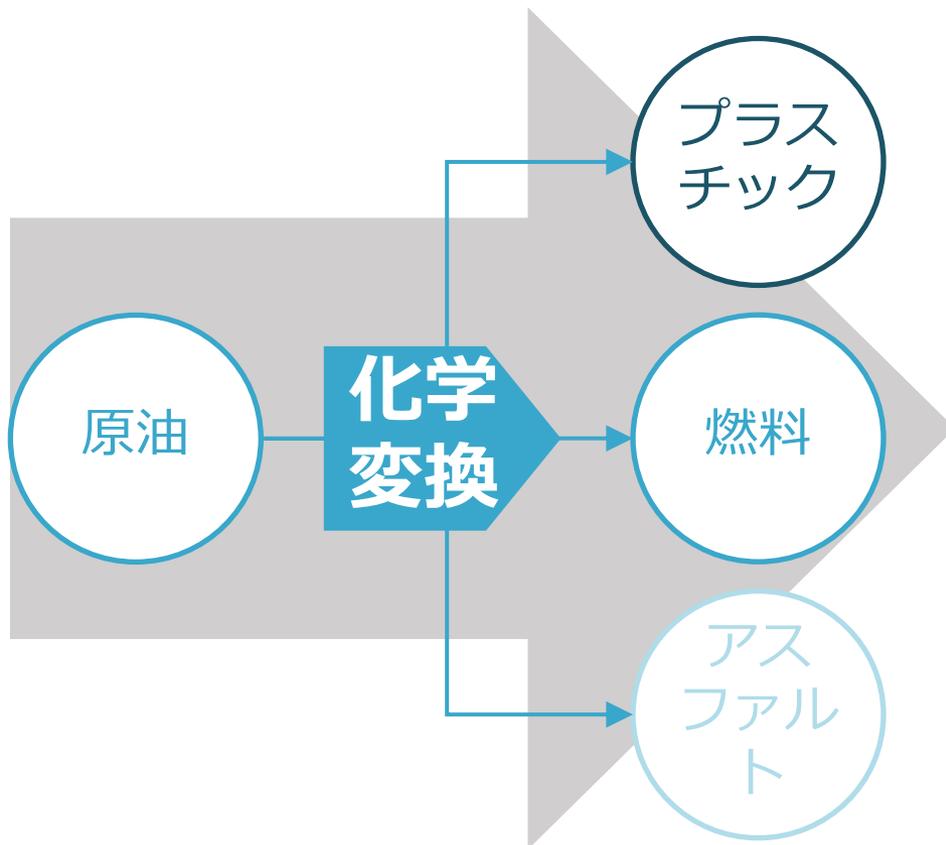
長岡技術科学大学 技学研究院 技術科学イノベーション系

助教 中村彰宏

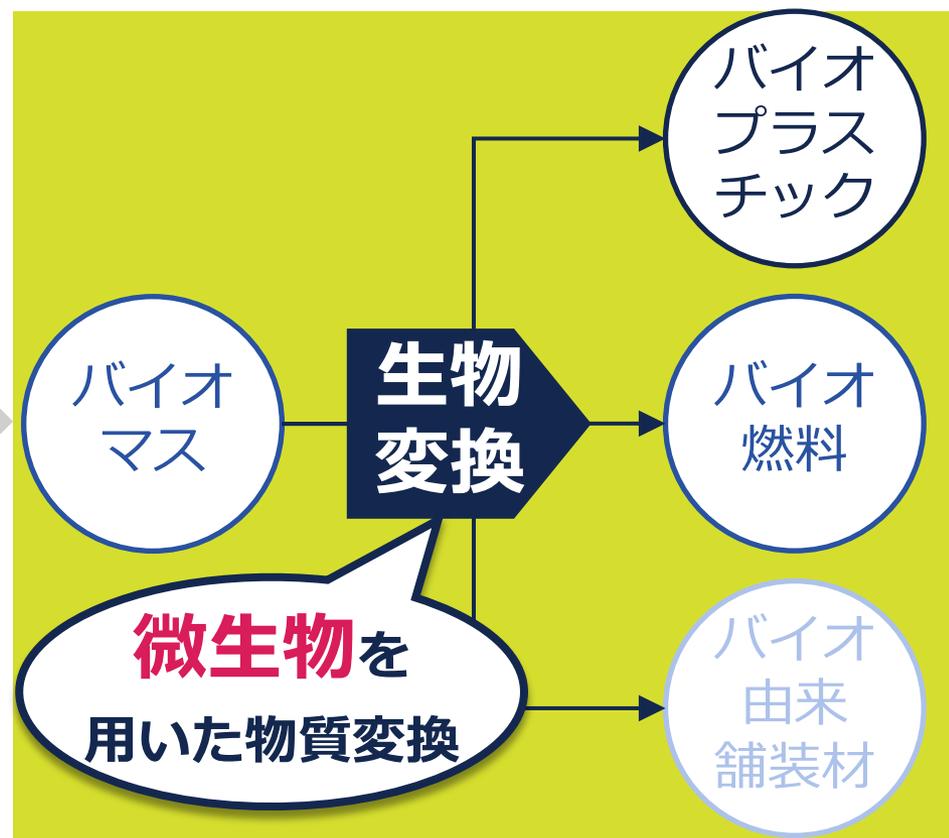
2024年6月13日

研究背景：バイオものづくり

石油資源由来ものづくり

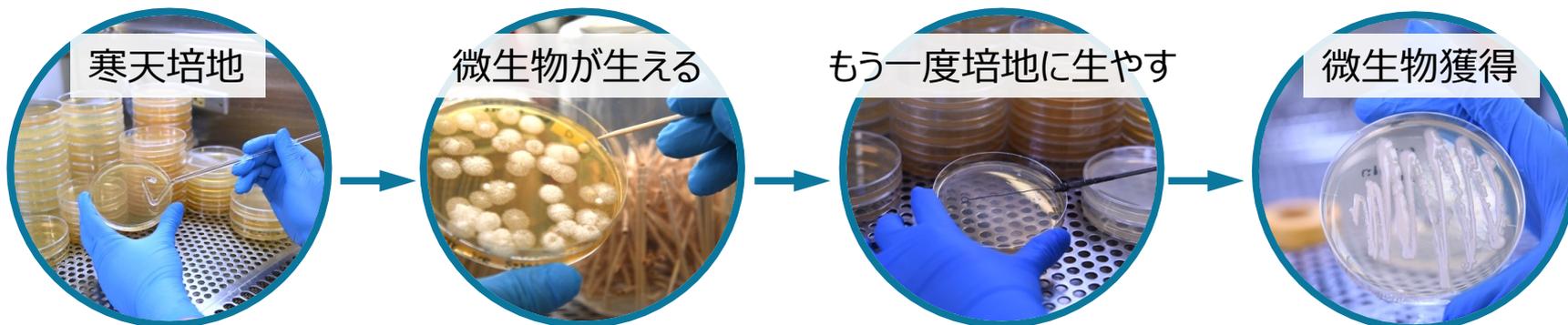
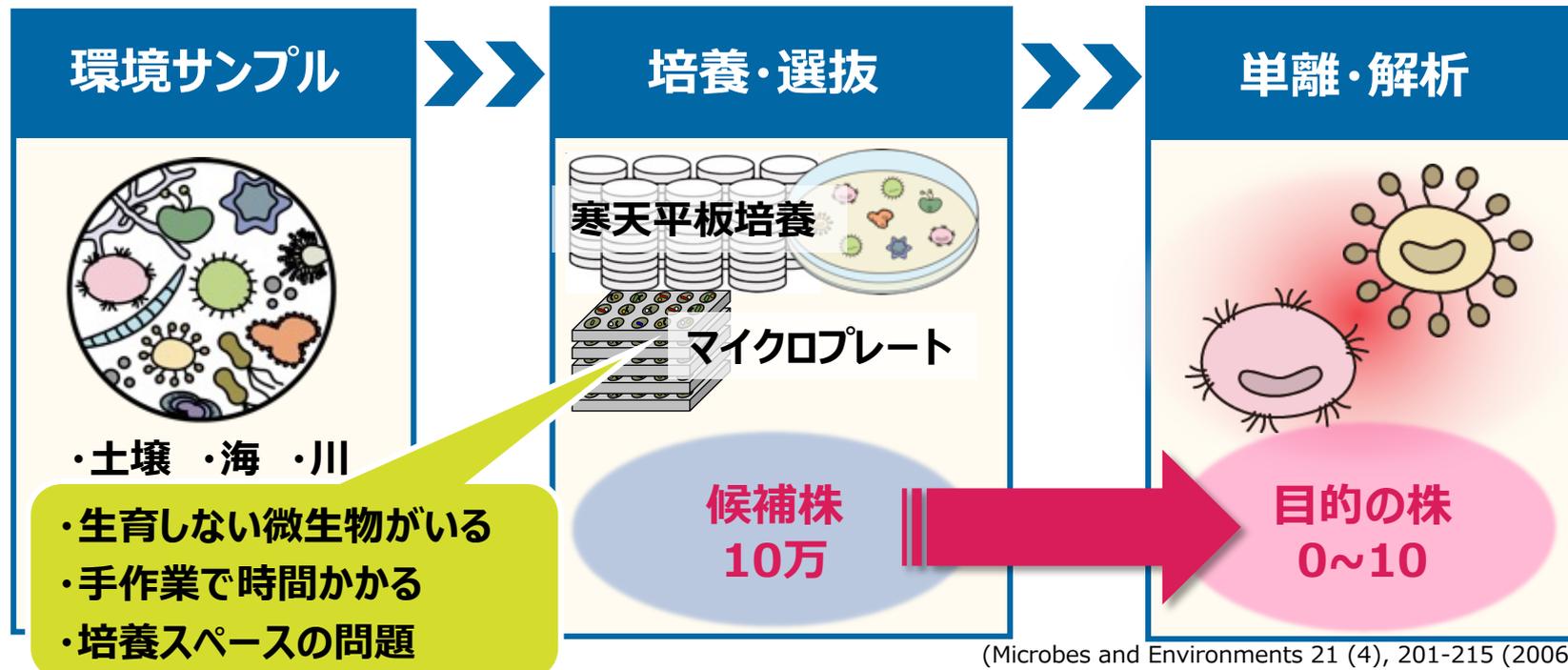


バイオものづくり



バイオものづくりは経済成長と環境負荷低減
の一挙両得な技術として期待

研究背景：バイオものづくりと微生物の探索

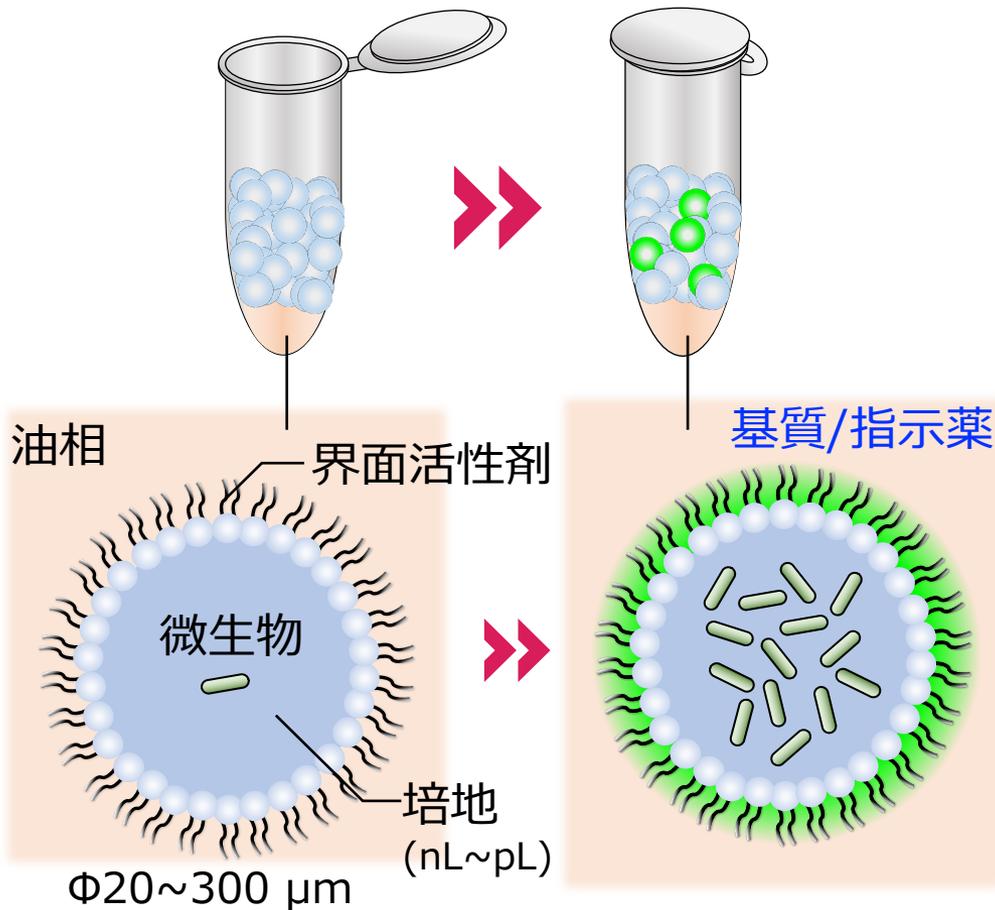


高効率なスクリーニング技術が求められている

ドロップレットスクリーニング技術①

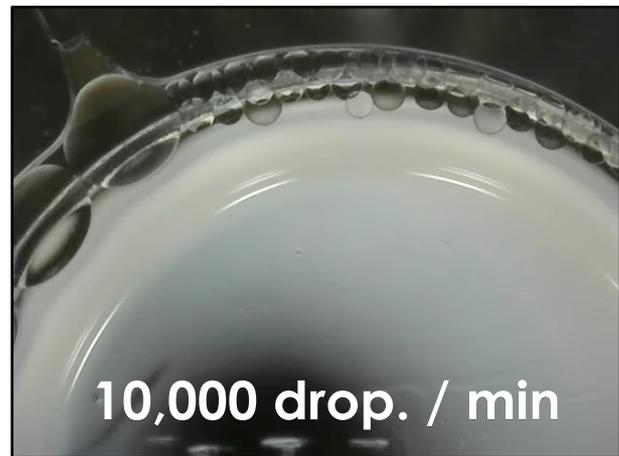
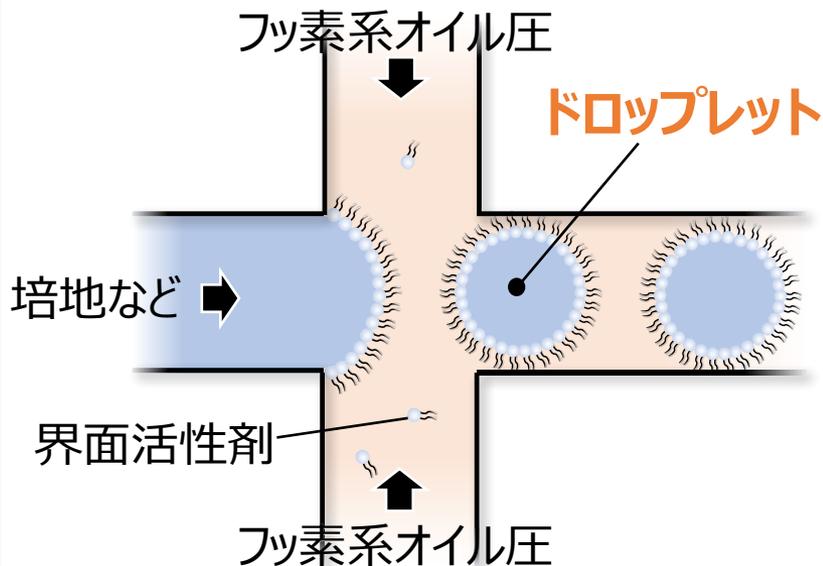
w/o ドロップレットを用いた微生物培養

ドロップレットのまま培養

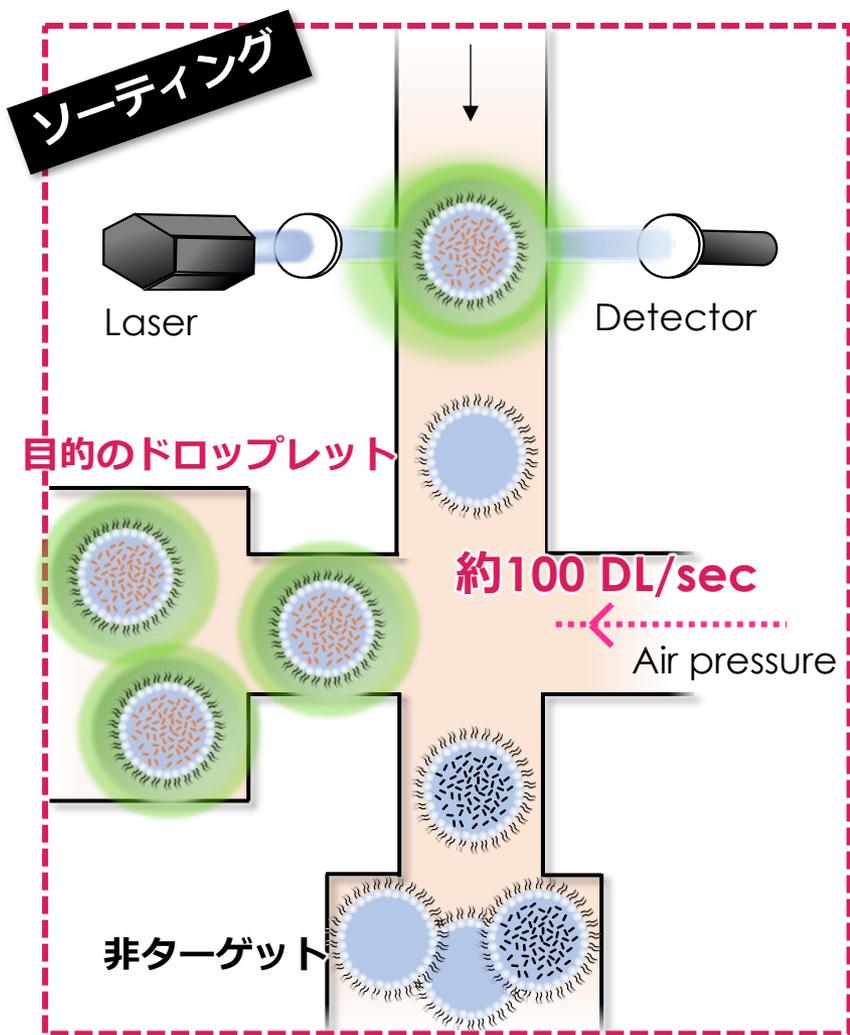


微生物の増殖と機能を同時に検出

ドロップレット生成の様子



ドロップレットスクリーニング技術②



特徴

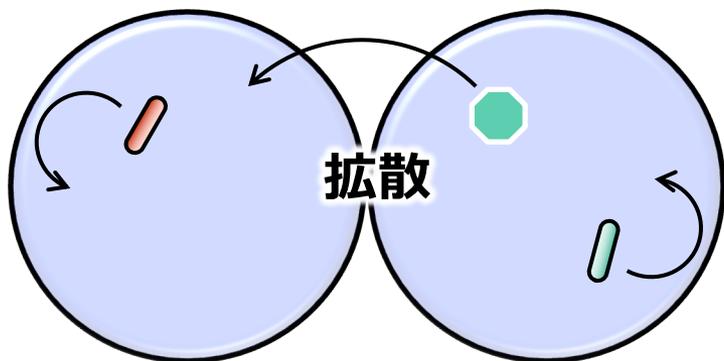
- ① 高効率
- ② 区画化
- ③ 微小化

ドロップレット =
微小なフラスコ (培養器)
の状態で、選抜が可能

超高効率なスクリーニング技術

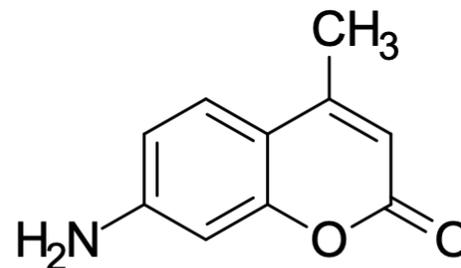
従来技術とその課題

疎水性化合物の移動



- 微生物や親水性化合物は蓄積
- 疎水性化合物は油相を介して、拡散=漏れる

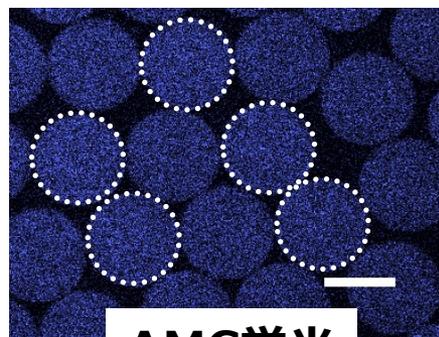
**基質/指示薬などで
疎水性の物質は使用できない**



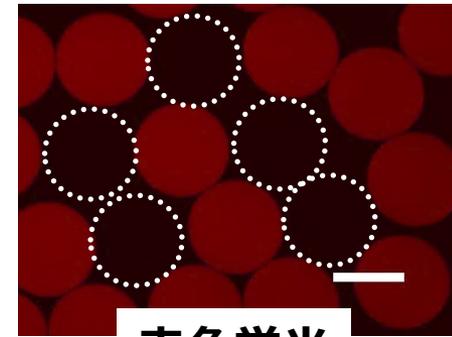
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)

**プロテアーゼなどの酵素活性の
蛍光基質として広く使用 (青色蛍光)**

赤色蛍光色素のドロップレットと混合すると



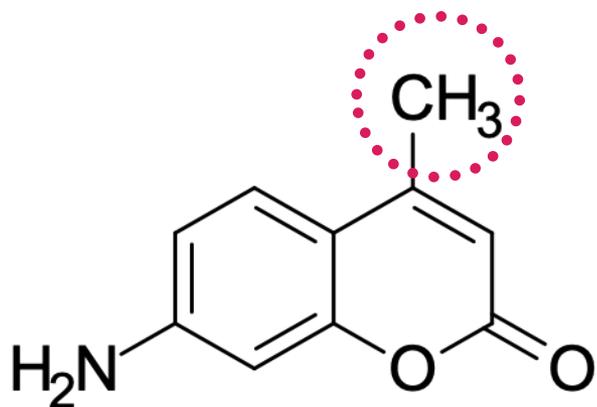
AMC蛍光



赤色蛍光

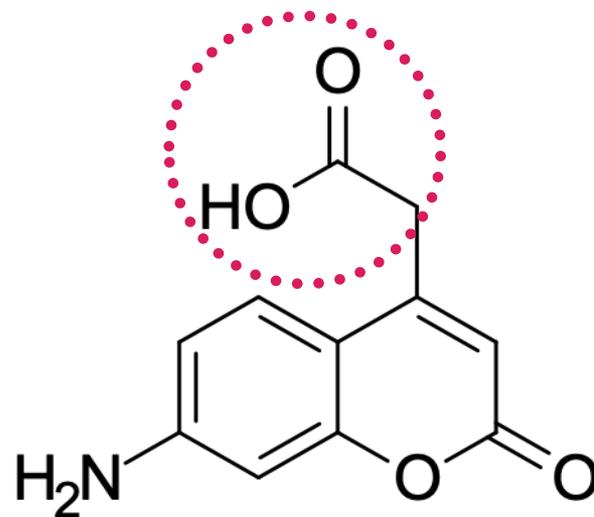
AMCは油相を介して、他のドロップレットに漏洩

新しい化合物 (技術) の特徴と比較



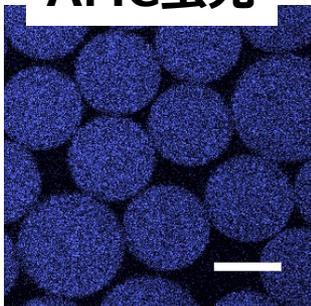
7-Amino-4-methylcoumarin
(AMC)

官能基を変更



7-Aminocoumarin-4-acetic acid
(ACA)

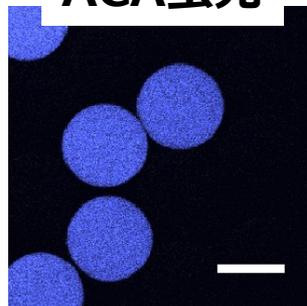
AMC蛍光



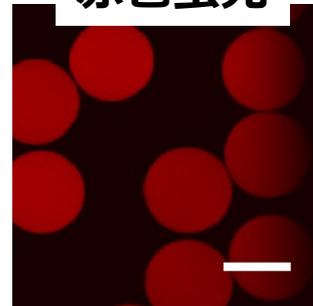
赤色蛍光



ACA蛍光

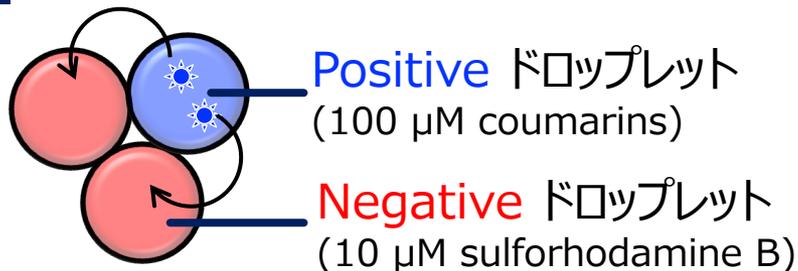


赤色蛍光



ドロップレットから漏れないクマリン系基質を開発

新技術の内容：ドロップレット内での保持性の検証



室温

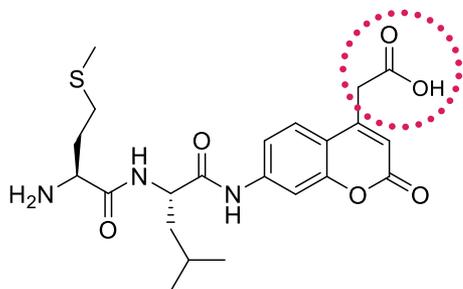


Coumarins	名視野 (Day 7)	青色蛍光 (Day 7)	赤色蛍光 (Day 7)	Ratio (Day 0)	Ratio (Day 7)	MiLog P
<chem>Cc1c(O)c(N)cc2oc(=O)cc12</chem> AMC				1.01	1.01	1.44
<chem>Cc1c(O)cc(N)cc2oc(=O)cc12C(=O)O</chem> AMCA-H				18.83	6.57	0.80
<chem>Cc1c(O)cc(N)cc2oc(=O)cc12C(=O)O</chem> ACA				22.77	26.35	0.42
<chem>Cc1c(O)cc(N)cc2oc(=O)cc12S(=O)(=O)O</chem> ACMS				64.86	73.36	-1.95

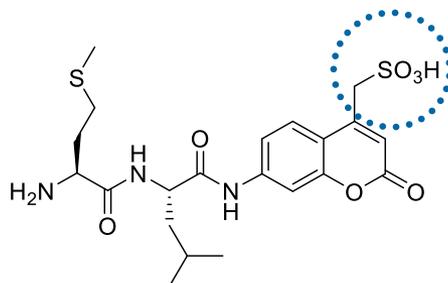
新技術の内容：ACA基質を用いた酵素活性検出

合成基質

神戸大学 日高先生との共同研究

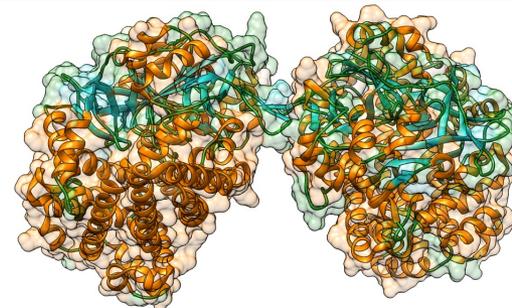


Met-Leu-ACA

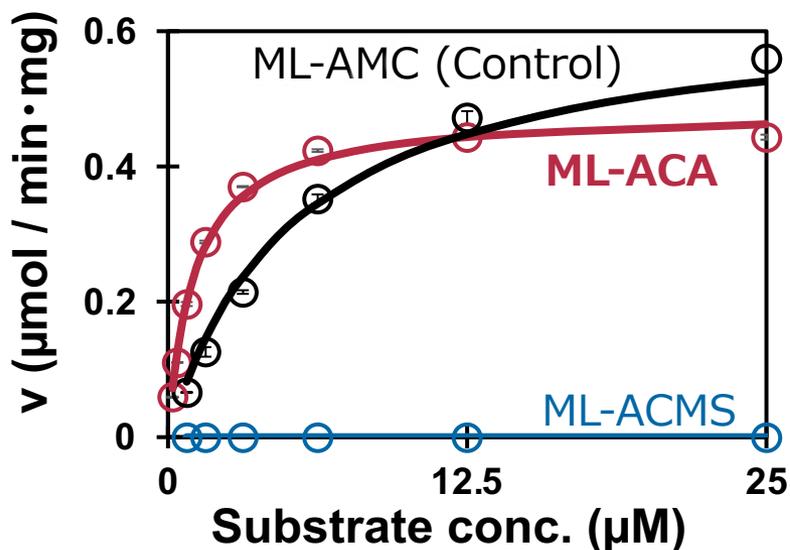


Met-Leu-ACMS

酵素 (PmDPP7)



Dipeptidyl peptidase (DPP) 7 from *Pseudoxanthomonas mexicana*



Substrate	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio to AMC
ML-AMC	5.30	0.811	0.153	1.00
ML-ACA	1.11	0.614	0.552	3.61
ML-ACMS	-	-	-	-

- Kinetics parameter is determined using Michaelis–Menten equation
- Buffer : 50 mM NaPBS (pH7.0) + 5 mM EDTA+0.005% Tween20
- Reaction : at 25 °C for 20 min
- 50 nM enzyme used

新技術の内容：酵素活性における親和性の増加

Enzymes	Substrates	K_m (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	Ratio of k_{cat}/K_m to AMC
PmDPP7	Met-Leu-AMC	5.30	0.811	0.153	1.00
	Met-Leu-ACA	1.11	0.614	0.552	3.61
SmDPP7	Met-Leu-AMC	21.1	0.849	0.0402	1.00
	Met-Leu-ACA	4.09	0.647	0.158	3.94
PgDPP11	Leu-Asp-AMC	10.6	5.22	0.492	1.00
	Leu-Asp-ACA	10.1	3.90	0.386	0.785
SmDPP11	Leu-Asp-AMC	45.0	18.0	0.401	1.00
	Leu-Asp-ACA	12.2	22.8	1.88	4.68

• Synthesized by Dr. Hidaka, Kobe University
 • Kinetics parameter is determined using Michaelis–Menten equation
 • Reaction : at 25 °C for 20 min
 • Buffer : 50 mM NaPBS (pH7.0) + 5 mM EDTA+0.005% Tween20

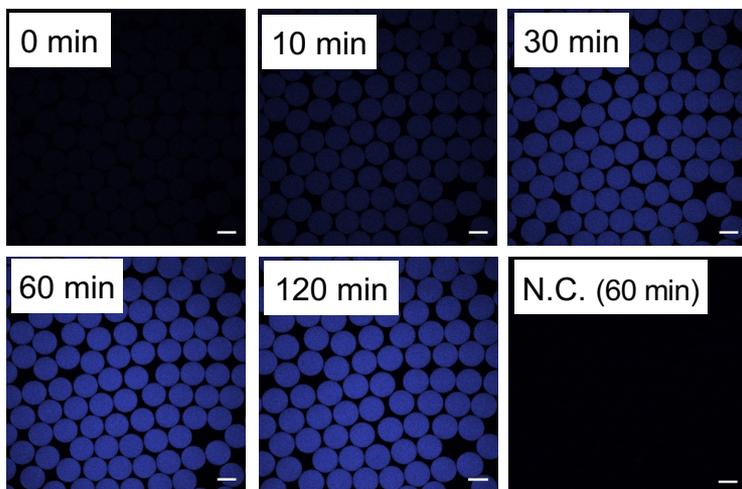
• PmDAPBII : DPP7 from *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24
 • SmDPP7 : DPP7 from *Stenotrophomonas maltophilia* K279a
 • PgDPP11 : DPP11 from *Porphyromonas gingivalis* W83
 • SmDPP11 : DPP11 from *S. maltophilia* K279a

K_m 値の減少に起因して、PgDPP11を除く各酵素での基質特異性が増加

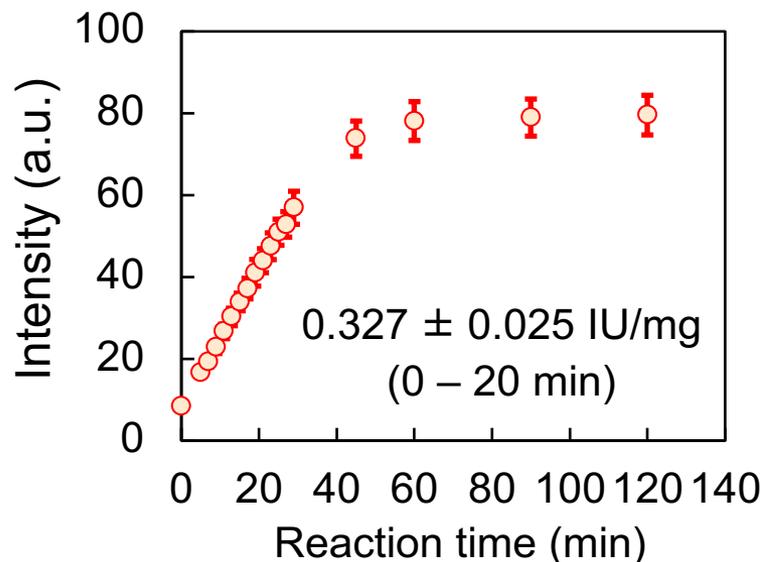
新技術の内容：ドロップレット内酵素活性の検出



Met-Leu-ACA + PmDPP7



• Buffer : 50 mM NaPBS (pH7.0) + 5 mM EDTA
• 50 nM enzyme used



**ACAの青色蛍光が時間経過とともに増加
ドロップレットで測定された活性は、
バルクでの活性と同等の値を示した**

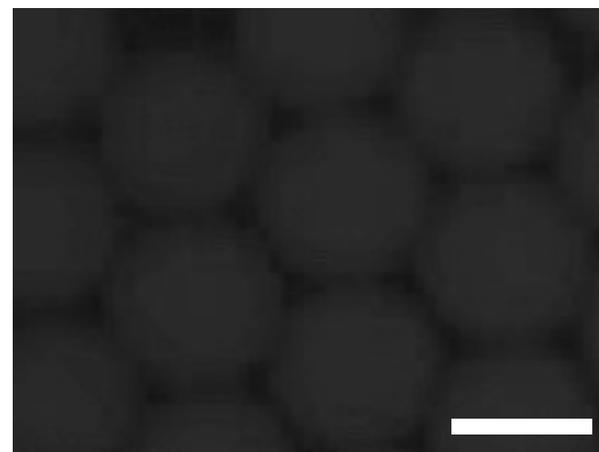
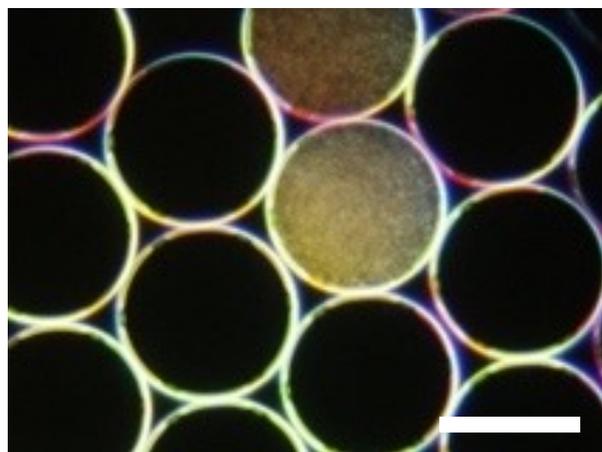
新技術の内容：WODL内での微生物酵素の検出

基質

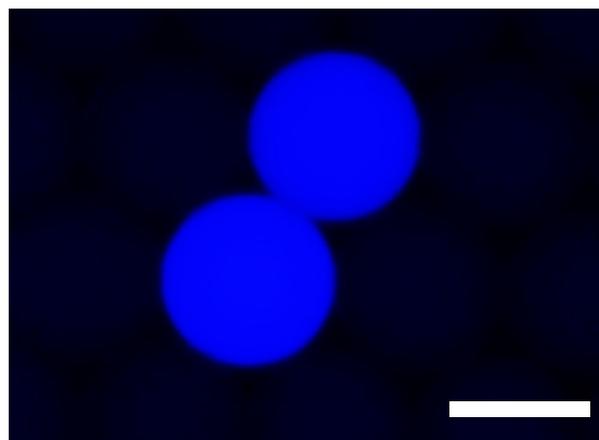
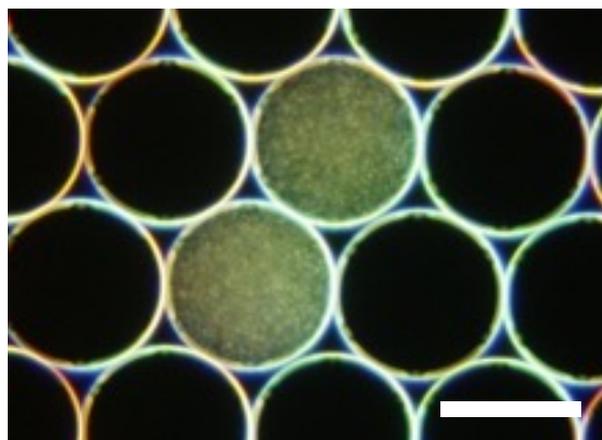
暗視野

蛍光 (活性)

低親水性
AMC
基質



開発した
高親水性
ACA
基質



スケールバー100 μm

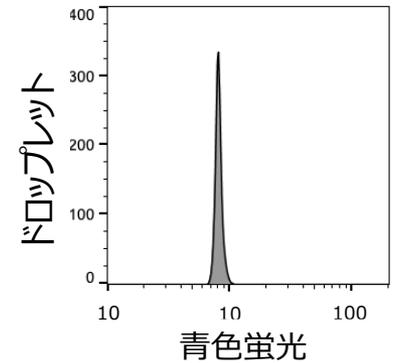
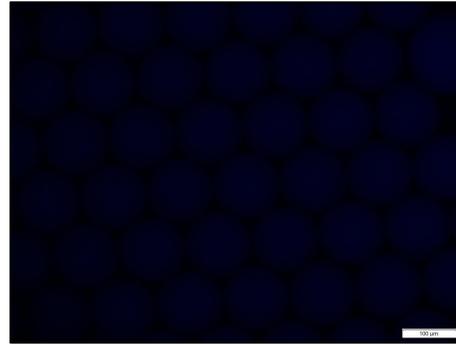
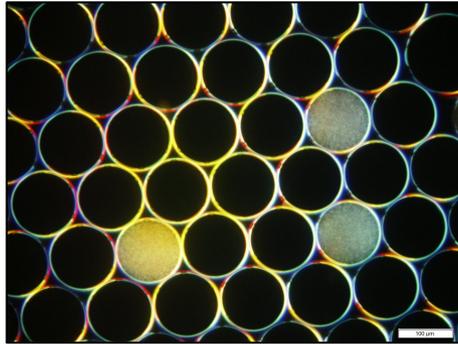
新技術の内容：WODL内での微生物酵素の検出

暗視野観察

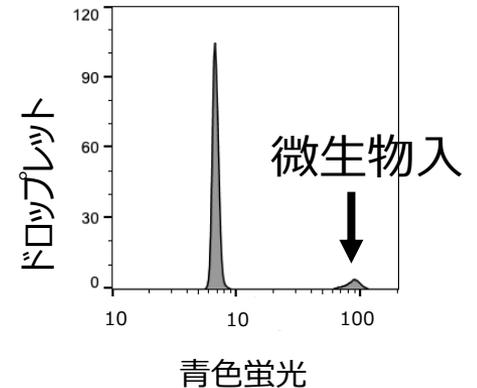
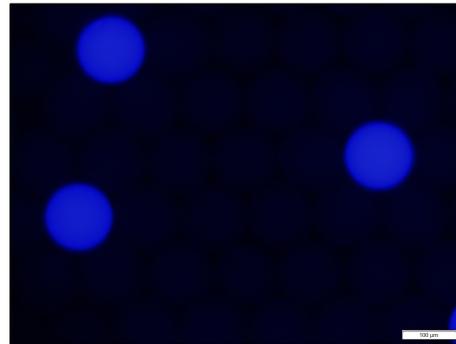
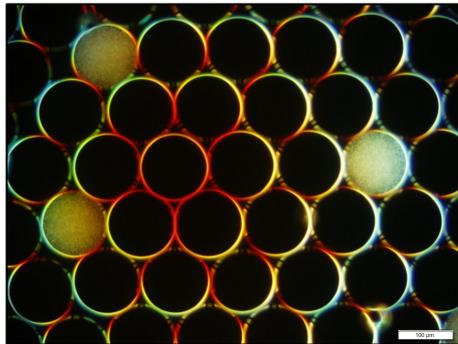
青色蛍光観察

ドロップレットソーター

AMC
基質



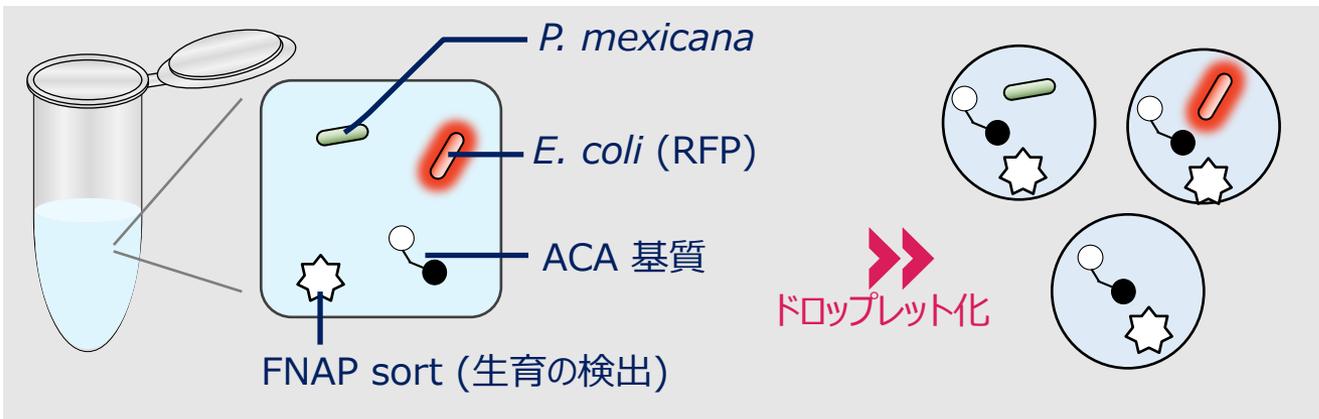
ACA
基質



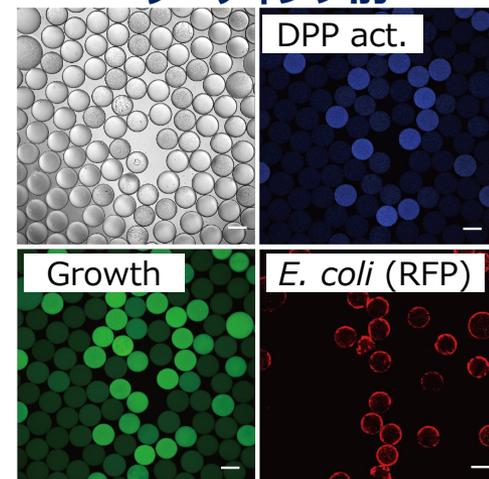
ドロップレットソーターを用いて高効率に微生物の酵素活性を検出

新技術の内容 :

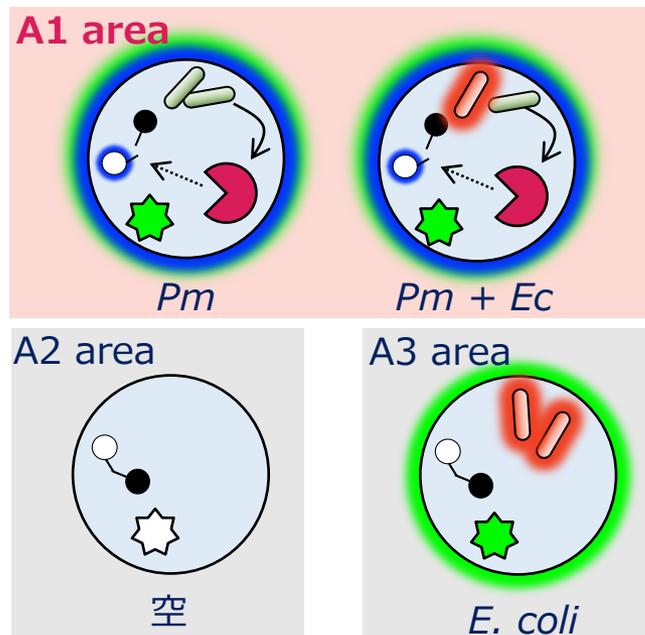
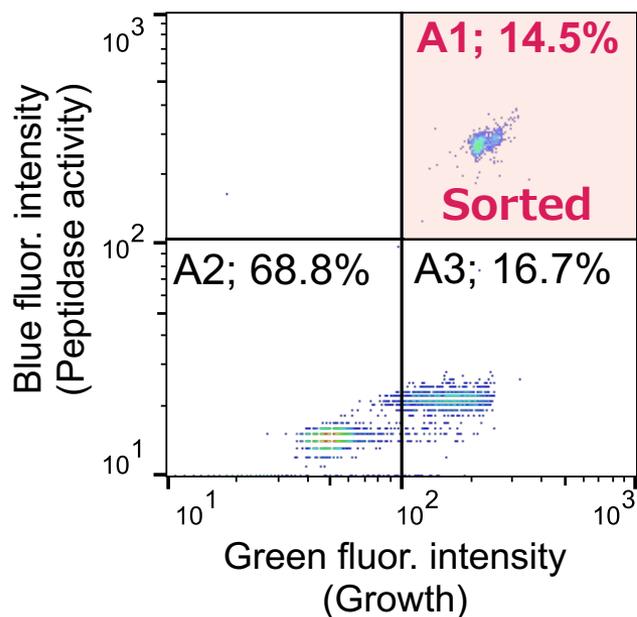
2種微生物の混合溶液からの微生物細胞の単離



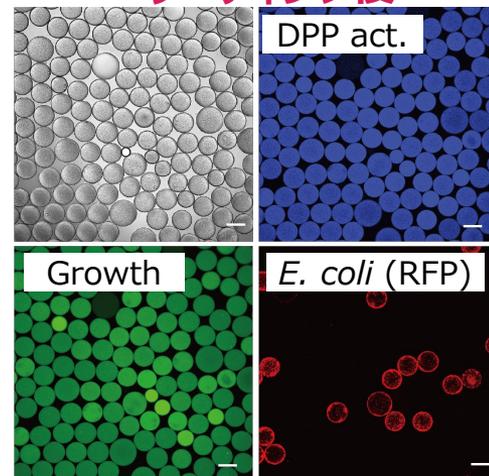
ソーティング前



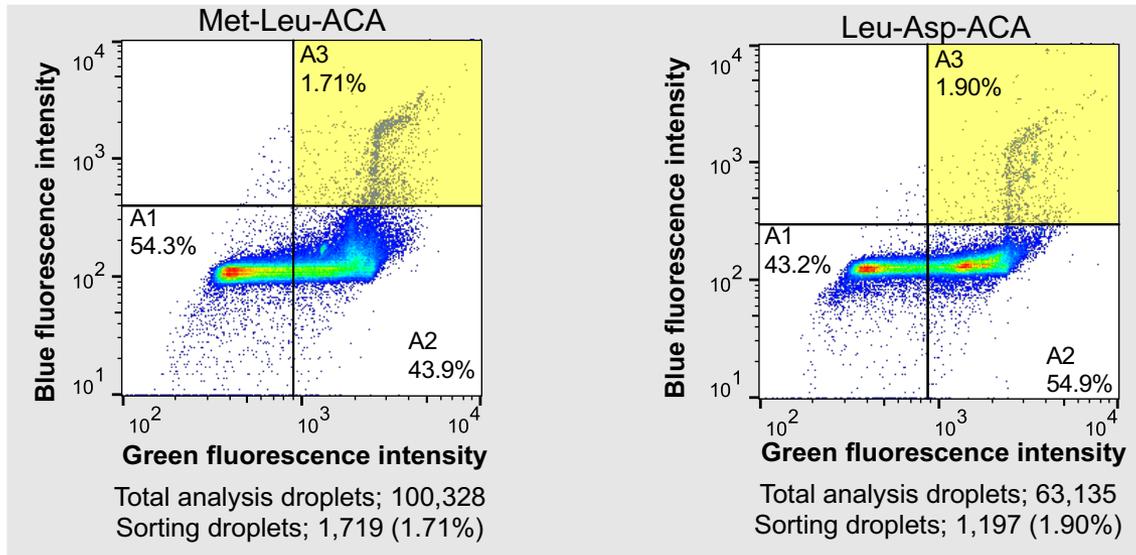
ソーティングプロット



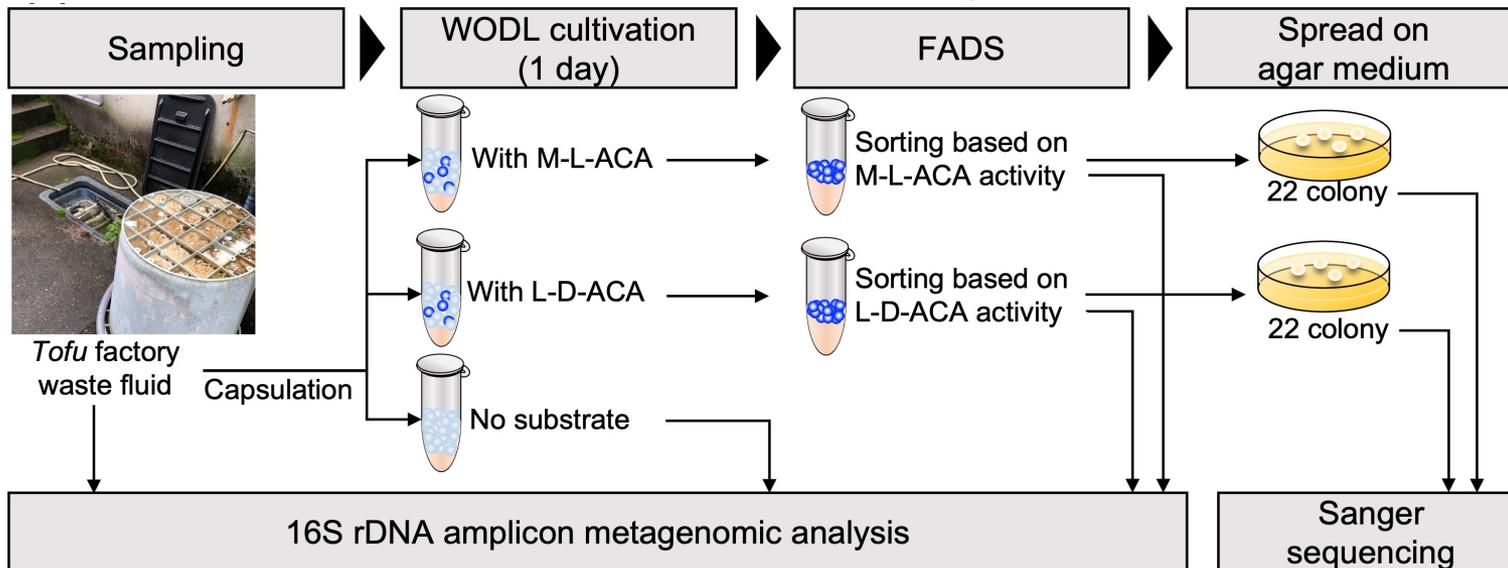
ソーティング後



新技術の内容： 環境からプロテアーゼ活性に基づく微生物探索



合計 160,000 ドロップレット
を解析して、A3エリアを単離



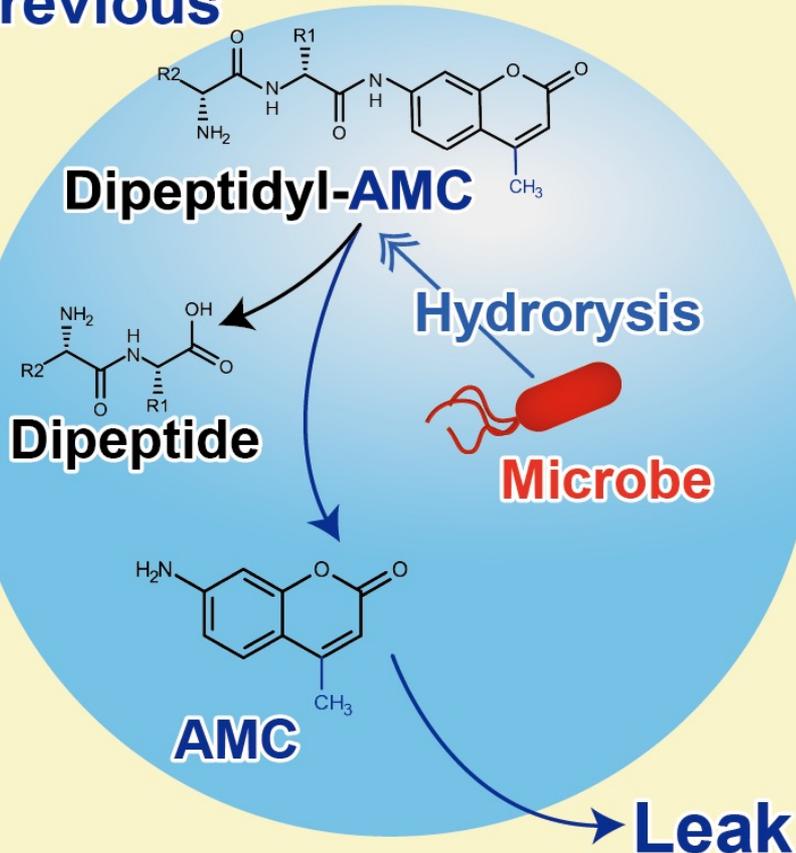
新技術の内容：単離微生物の遺伝子解析

Sample specificity	Species Identification		BLAST analysis, gene possession=○			
	Strains	Identify (%)	DPP3	DPP5	DPP7	DPP11
Common	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	99.7	-	-	-	-
	<i>Pseudoduganella danionis</i>	98.2	-	○	○	○
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99.0	-	○	○	○
	<i>Chryseobacterium camelliae</i>	95.2	-	○	○	○
	<i>Flavobacterium chilense</i>	99.6	-	○	○	○
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.7	-	○	-	-
M-L-ACA Specific	<i>Enterobacter soli</i>	99.4	-	-	-	-
	<i>Falsarthrobacter nasiphocae</i>	98.1	-	○	-	-
	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	99.4	-	○	○	○
	<i>Stenotrophomonas terrae</i>	99.0	-	○	○	○
	<i>Lactococcus lactis</i>	99.8	-	-	-	-
	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.2	-	-	-	-
	<i>Klebsiella grimontii</i>	99.0	-	-	-	-
	<i>Cronobacter dublinensis</i>	99.6	-	-	-	-
	<i>Moraxella osloensis</i>	99.1	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas otitidis</i>	99.8	-	-	-	-
	<i>Brevundimonas faecalis</i>	99.1	-	-	-	-
	<i>Massilia violacea</i>	99.8	-	○	○	○
L-D-ACA Specific	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	99.7	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas protegens</i>	99.8	-	-	-	-
	<i>Chryseobacterium gallinarum</i>	99.5	-	○	○	○
	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	99.8	-	-	-	-
	<i>Chryseobacterium taihuense</i>	97.6	-	○	○	○
	<i>Flavobacterium ginsengiterrae</i>	96.4	○	○	○	○
	<i>Pararheinheimera arenilitoris</i>	98.1	-	-	-	-
	<i>Chryseobacterium arachidis</i>	98.5	-	○	○	○
	<i>Sphingomonas trueperi</i> strain	99.9	-	○	○	-
	<i>Pseudomonas japonica</i>	98.9	-	○	-	-
	<i>Cloacibacterium haliotis</i>	98.6	-	○	○	○
	<i>Brevundimonas terrae</i> strain	99.4	-	○	○	○

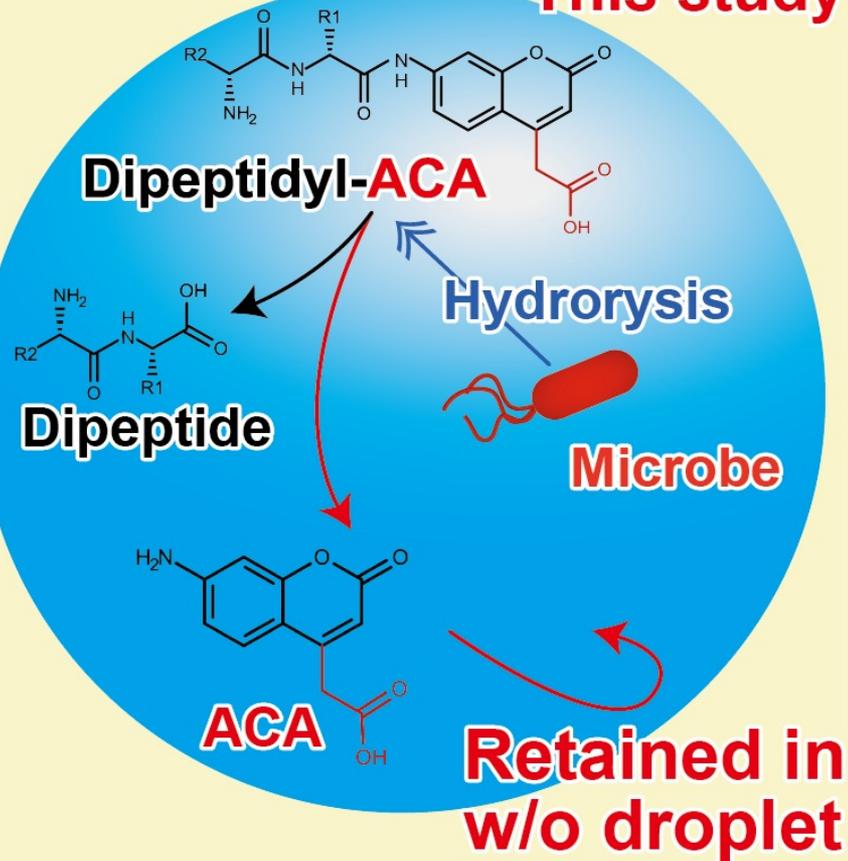
30種の単離微生物のうち16種の微生物がプロテアーゼ遺伝子を持つ

新技術の内容のまとめ

Previous



This study



液滴で使用可能なクマリン系基質である7-アミノ-4-酢酸 (ACA)
基質を開発し、環境微生物のハイスループット・スクリーニング
への応用を実証

想定される用途

- 主に研究開発分野において、酵素・機能活性の試薬としての用途が期待される
- w/oドロップレットを用いたスクリーニングは微生物から動物細胞まで解析対象とされており、本基質の開発・販売による応用範囲の拡大は発酵産業から医薬品まで、様々な研究開発を促進する
- 上記以外にドロップレットを用いた微生物の探索、検出や疾患の診断法など、市場・サービスに直結した波及効果も期待される

実用化に向けた課題と企業様への期待

- 通常の微生物の培養条件では使用可能であるが、その他、使用可能な条件の洗い出しが必要である
- 検証ではジペプチドを結合した基質を用いたが、基質領域を改変することで、基質種類の拡大を狙う
- 微生物(細菌)における使用方法を提示したが、その他哺乳細胞など他の細胞への応用性を検証する
- ドロップレットスクリーニングを用いた微生物スクリーニングを行いたい企業様には、本技術の導入が有効であると考えられる

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：

「ペプチダーゼ基質および酵素検出方法」

- 出願番号：

「特願2022-161898」

- 出願人：

「国立大学法人 長岡技術科学大学」

- 発明者：

「小笠原 渉、中村 彰宏」

問い合わせ先

- 国立大学法人 長岡技術科学大学

産学連携・研究推進課 知的財産係

- T E L 0258-47-9279

- e-mail patent@jcom.nagaokaut.ac.jp