

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14231

研究課題名(和文)ゲノム・フェノーム統合スクリーニング系を可能にするハイスループット培養法の確立

研究課題名(英文)High-through culture method enabling the genome-phenome integration screening system

研究代表者

小笠原 渉(Ogasawara, Wataru)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：40292172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、ゲノム解析と網羅的表現型解析“フェノーム解析”を統合した次世代型スクリーニング系「ゲノム・フェノーム統合スクリーニング」の開発である。それには、1細胞の分離法、培養法およびスクリーニング系が必要不可欠である。そこで比較的難易度の低い「真核微生物の1細胞スクリーニング系の確立」の試み、油脂生産酵母の高油脂変異体のスクリーニングに成功した。次に、比較的難易度が高い「真正細菌の培養・スクリーニング系の確立」を試み、water-in-oilエマルション(油相内に水相が分散)を用いた微生物培養法を用いて、モデル生物の培養とスクリーニングならびに環境微生物の培養と菌叢解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this study is the development of a next generation screening system "genome-phenome integration screening system" that integrates genome analysis and comprehensive phenotypic analysis. For this study, one cell separation, cultivation and screening system are essential. Therefore, we attempted "establishment of a cell screening system for eukaryotic microorganisms" relatively easy. We succeeded in screening of higher lipid production oleaginous yeast strain. Next, we attempted "establishment of screening system for eubacteria" relatively difficult. We succeeded in cultivation and screening of model organisms, cultivation of environmental microorganisms and microbial flora analysis.

研究分野：生物資源工学

キーワード：微生物スクリーニング エマルション

1. 研究開始当初の背景

自然界において、人類が明らかにしている微生物は約1%に過ぎない。ゲノム解析技術の発展から、創薬および有価物などを微生物資源から生産する動きが活性化しており、高精度かつハイスループットなスクリーニング系（選択・取得系）が求められている。従来、自然界からの有用微生物のスクリーニングは、1種類の表現型を評価軸に莫大な労力と時間を投入して行われてきており、1つの表現型が優れた株しか単離出来ない（図1）。環境微生物のDNAスクリーニングであるメタゲノム解析は、遺伝資源を取得できるがその由来となる微生物やその表現型は取得できない。研究開始当初から現在まで、哺乳類細胞を対象とした1細胞ゲノム解析が加速しているが、1細胞における表現型の網羅的解析（フェノーム解析）は、極めて困難である。これらの課題を解決するために、多数の細胞が持つ表現型を同時に解析することが可能な次世代型スクリーニング系が必要である

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ゲノム解析と網羅的表現型解析“フェノーム解析”を統合した次世代型スクリーニング系「ゲノム・フェノーム統合スクリーニング」の開発である。この次世代型スクリーニング系の基盤となる「膨大な微生物を低コストで再現性よく培養する技術開発」を目指し、ナノサイズの立体成型技術を用いて、バイオメテック加工されたマイクロサイズかつ並列化された培養系を確立し、ハイスループット培養技術が必要である。そこでまず環境微生物を1細胞を分離した後に培養すると共に、スクリーニング法を確立する。そこで比較的難易度の低い「真核微生物の1細胞スクリーニング系の確立」および難易度が高い「真正細菌の培養・スクリーニング系の確立」を試みた。

3. 研究の方法

(1) 真核微生物の1細胞スクリーニング系の

確立

油脂酵母のスクリーニング：油脂を染色することができる試薬 Nile red を用いることで酵母菌体内の脂肪球を染色したのち、染色した菌体群をセルソーター（細胞や染色体を連続的に移動する小さい液滴の中に閉じこめ、それに主にレーザー光を利用した励起光を照射して生じる回折光や蛍光の大きさと波長から、特定の細胞の分布の調査や特定の細胞を分取することができる装置）を用いて分取した。

(2) 真正細菌の培養・スクリーニング系の確立
エマルション形成：数種類の培地、油、界面活性剤を組み合わせ、ドロップレット生成圧力を変化させてエマルションを生成した。エマルションに封入される生物数は、ポアソン分布を用いた数値計算により、最適な菌体濃度を算出して調節した。

エマルションのスクリーニング：蛍光基質である EnzChek Peptidase/Protease Assay Kit (Thermo 社) を用いてペプチダーゼ活性によるスクリーニングを試みた。

菌叢解析：ビーズ破砕した菌体をフナコシ社のセラミック/シリカ複合材により安定化と精製を行った後、シリカカラムによって最終精製した。PCR で増幅した 16S-rRNA 領域を MiSeq (illumina 社) で配列解析を行い、MacQiime によりデータ解析した

4. 研究成果

(1) 真核微生物の1細胞スクリーニング系の確立

真核微生物のスクリーニング系を確立するために、油脂生産酵母のスクリーニング方法の検討・確立を試みた。我が国は油脂自給率がカロリーベースで約3%と低いため、輸入に依存しない安定した油脂供給プロセス開発が必要とされている。現在、新たな油脂供給源として細胞内に大量の油脂を蓄積する微生物が注目されている。そこで、「核微生物の1細胞

胞スクリーニング系」の目的の微生物機能を「油脂生産」とし、油脂生産酵母を題材とした油脂生産微生物のスクリーニング方法の検討・確立を行った。その結果、油脂を蓄積している酵母細胞のみを取得することに成功した。これより、環境微生物サンプルを Nile red で染色し、セルソーターを用いることで分離する方法を確立した。さらに、油脂酵母を紫外線処理して突然変異を誘発させた変異株群をスクリーニングした (図1)。

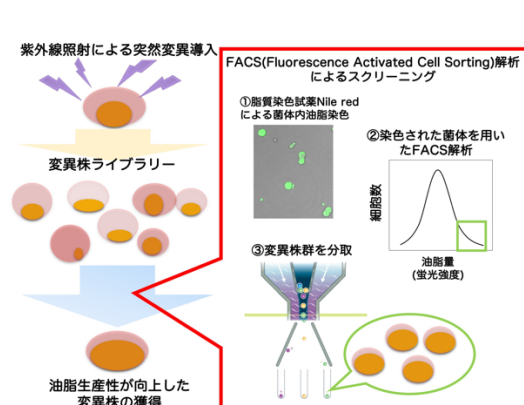


図1 油脂高生産変異油脂酵母株のスクリーニング

セルソーターを用いた一次スクリーニング (FACS 解析) の後、52 株を 96 穴プレートを用いた二次スクリーニングに供した結果、油脂生産性が 26% 向上した株が得られた。(図2)。

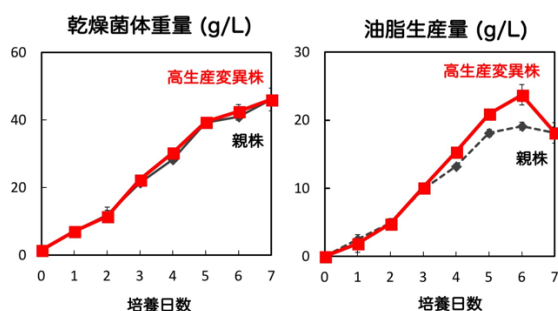


図2 油脂高生産変異株の油脂生産性

この株は、生成バイオマス量を意味する乾燥菌体重量は変わらず、油脂生産量だけが向上していた。このことから、油脂構成関連酵素への変異が示唆される。

以上より、真核生物の1細胞スクリーニング系が確立できたことから、より難易度の高い真正細菌の培養・スクリーニング系の確立に着手した。

(2) 真正細菌の培養・スクリーニング系の確立

近年、water-in-oil エマルジョン (油相内に水相が分散) を用いた微生物培養法が注目を浴びている (図3)。

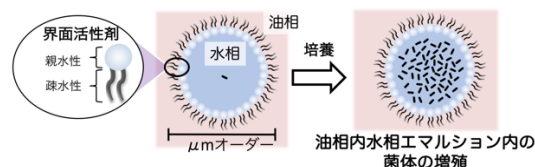


図3 エマルジョンを用いた微生物培養

本培養法には、オイルで区切られた数万単位の微小区画「ドロップレット」を扱えること、ハイスループットであることおよびガス透過性が高い等の利点がある。しかし、微生物が1細胞ずつ単離されたドロップレットの形成から培養、解析までのメソッドが確立されておらず、あまり普及していない。そこで、本研究課題の目的である「環境微生物の単離培養」に活用するため、本法の確立を試みた。

はじめに、界面活性剤、オイルの種類、培地成分やドロップレット形成条件の検討を試みた。その結果、直径 30~360 μm の間でのドロップレットサイズ制御と一ヶ月以上安定的なドロップレット形成に成功した。続いて、モデル微生物である大腸菌および偏性好気性細菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* を含むドロップレット形成と培養に成功した。さらに、封入微生物数の制御および培養に成功した (図4)。

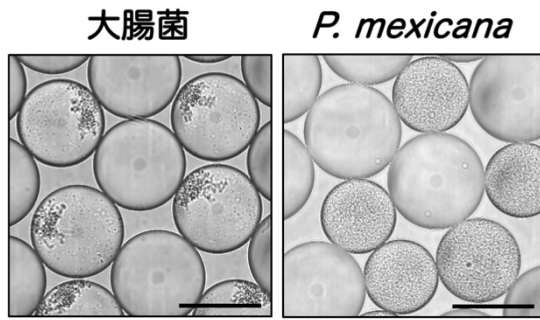


図4 ドロップレット中で生育した大腸菌と *P. mexicana*。1 ドロップレットあたり1細胞になるようにエマルジョンを形成し、1日培養。

次に、側方散乱光やペプチド系蛍光基質を用いたスクリーニング系の確立も試みた。側方散乱光については問題なく利用できた一方、ペプチド系蛍光基質については、酵素分解によって生成した蛍光物質が油層へ移行してしまう問題が生じ、困難であった。何種類かの基質検討した結果、酵素活性での分離（ソーティング）に成功した（図5）。

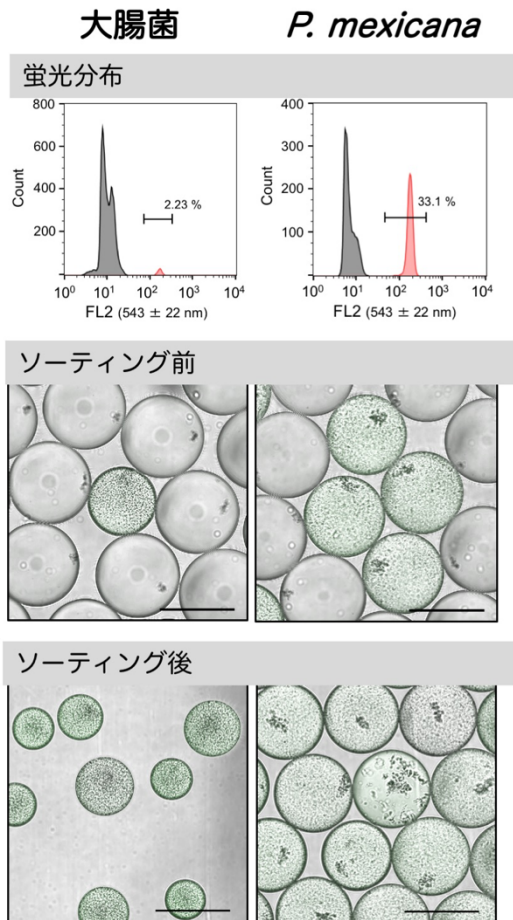


図5 蛍光ペプチド基質を用いたソーティング

モデル微生物のドロップレット形成と培養に成功したため、次に実際の環境微生物解析を試みた。まず、土壌等から採取したサンプルから微生物を抽出し、ドロップレット形成と培養を試みた。培養に従いドロップレットの崩壊する等の問題が生じたが、条件検討によりこの問題の克服に成功した。

土壌微生物の培養に成功したため、エマルジョン培養を用いた菌相解析の基盤構築を目的として、土壌微生物の菌相解析を行った。培養を介さずに土壌サンプルを直接解析した物をコントロールとして、プレート培養、液体培養およびエマルジョン培養サンプルの解析データを比較して菌叢解析を行った。その結果、エマルジョン培養は、それぞれの培地でプレート培養・液体培養両方と異なる傾向を示した（図6）。

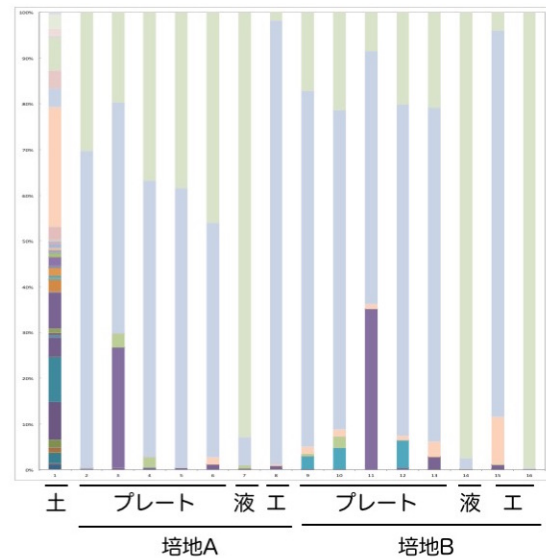


図6 菌叢解析

土、土壌；プレートプレート培養；
液、液体培養；エ、エマルジョン培養

エマルジョン培養では、それ以外の培養法ではほとんど成育しない微生物も複数観察された。例えば、ある属の微生物は、土壌中で5.5%の割合で存在しており、エマルジョン培養法では1.5%検出された一方で、エマルジョン培養以外の培養法では多くても0.01%程度しか検出されなかった。エマルジョン培養は、他の培養法と比べて培地成分に対する感受性が

高い傾向があるため、培地成分の調節によって単離微生物を調節可能だと考えられる。この解析により、サンプルの採取場所や培養条件や、ドロップレット形成条件による菌叢の際を明らかにできた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Saori Roppongi, Yoshiyuki Suzuki, Chika Tateoka, Mayu Fujimoto, Saori Morisawa, Ippei Iizuka, Akihiro Nakamura, Nobuyuki Honma, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Nobutada Tanaka, Yasumitsu Sakamoto, Takamasa Nonaka, Crystal structures of a bacterial dipeptidyl peptidase IV reveal a novel substrate recognition mechanism distinct from that of mammalian orthologues, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.8, Article number 2714, 2018, Doi : 10.1038/s41598-018-21056-y.
- ② Saori Roppongi, Chika Tateoka, Mayu Fujimoto, Ippei Iizuka, Saori Morisawa, Akihiro Nakamura, Nobuyuki Honma, Yoshiyuki Suzuki, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, Nobutada Tanaka, Yasumitsu Sakamoto, Takamasa Nonaka, Periplasmic form of dipeptidyl aminopeptidase IV from *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24: purification, kinetic characterization, crystallization and X-ray crystallographic analysis, *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, Vol.73, No.11, pp.601-606, 2017, Doi : 10.1107/S2053230X17014911

[学会発表] (計6件)

- ① 中村 彰宏、*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の基質認識機構の解明、日本農芸化学会 2018 年度大会、平成 30 年 3 月 17 日、名城大学 (愛知県・名古屋市)
- ② 本間宣行、部位特異的変異導入解析による Family S46 ペプチダーゼの基質認識残基の同定、平成 30 年 3 月 17 日、名城大学 (愛知県・名古屋市)

- ③ 中村 彰宏、WO24 由来 Dipeptidyl aminopeptidase IV の構造、第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、平成 30 年 3 月 5 日、京都大学桂キャンパス (京都府・京都市)
- ④ 鈴木 義之、糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの生産応答機構の解析、第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス、平成 29 年 11 月 17 日、佐賀市立東与賀文化ホール (佐賀県・佐賀市)
- ⑤ Akihiro Nakamura, Identification of Substrate Recognition Residues in Family S46 Peptidase from Gram-Negative Bacteria, The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka, 平成 29 年 10 月 6 日、長岡技術科学大学 (新潟県・長岡市)
- ⑥ Akihiro Nakamura, Identification of Substrate Recognition Residues in Family S46 Peptidase from Pathogenic Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria, IUMS2017 SINGAPORE, 平成 29 年 7 月 18 日、MARINA BAY SUNS (SINGAPORE)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

- ① 名称: ペプチド型細菌ジペプチジルペプチダーゼ7阻害剤
発明者: 小笠原 渉、日高 興士、津田 裕子、阪本 泰光
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許願 2017-156345 号
出願年月日: 平成 29 年 8 月 14 日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 改変プロモーター
発明者: 小笠原 渉、掛下 大視、柴田 望、志田 洋介
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特許願 2017-153983 号
出願年月日: 平成 29 年 8 月 9 日
国内外の別: 国内
- ③ 名称: 糸状菌変異株及びその利用
発明者: 小笠原 渉、柴田 望、志田 洋介
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2017/028122

出願年月日：平成 29 年 8 月 2 日
国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

○ホームページ

<http://www.microorganisms.jp/ogasawara-lab/>

○掲載記事

- ① 選択性が高く副作用の少ない DPP-4 阻害薬の開発へ 酵素の立体構造を解明、糖尿病リソースガイド、平成 30 年 2 月 19 日、
<http://dmrg.net/news/2018/02/018470.html?pr=dmrg009>
- ② DPP4 阻害薬のオフターゲット「DPP8/9」の類縁酵素の立体構造を解明－岩手医科大、医療ニュース、平成 30 年 2 月 15 日、
<http://www.qlifepro.com/news/20180215/stereostucture-of-dpp-8-9-related-enzyme.html>
- ③ 岩手医科大学などの研究グループ、糖尿病薬や抗がん剤開発に役立つ酵素の立体構造を解明、物質構造科学研究所 ニュース、平成 30 年 2 月 13 日、
<https://www2.kek.jp/imss/news/2018/topics/0209DAP4/>
- ④ 副作用少ない糖尿病薬 期待 ～長岡技科大教授ら 酵素の構造解明～、新潟日報モア、平成 30 年 2 月 10 日、
<http://www.niigata-nippo.co.jp/news/national/20180210373852.html>
- ⑤ 副作用少ない糖尿病薬 期待 ～長岡技科大教授ら 酵素の構造解明～、新潟日報、平成 30 年 2 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 渉 (OGASAWARA, Wataru)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：40292172