

2022年 10月

ミリオンスクリーニング技術 -100万検体の探索・育種技術-

長岡技術科学大学 発酵科学研究室

小笠原 渉 教授 (10月13日)

鈴木 義之 特任助教 (10月14日)

委託機関：長岡技術科学大学、産業技術総合研究所、広島大学、早稲田大学、
(株) オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株) ニコンソリューションズ

再委託機関：長岡高専、函館高専、鶴岡高専、都城高専

バイオものづくり研究開発における位置づけ

- 背景とミリオンスクリーニング技術の特徴
- 基盤技術開発
- スクリーニング事例：①単離株の育種
- スクリーニング事例：②環境微生物探索

バイオものづくり研究開発における位置づけ

□ 背景とミリオンスクリーニング技術の特徴

□ 基盤技術開発

□ スクリーニング事例：①単離株の育種

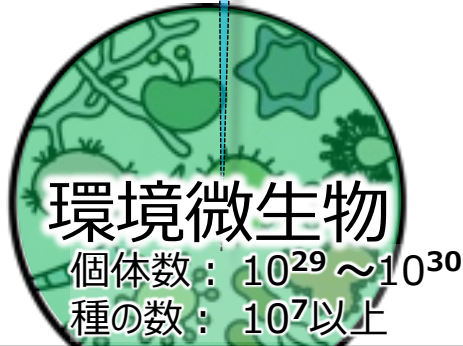
□ スクリーニング事例：②環境微生物探索

バイオものづくり研究開発における位置づけ



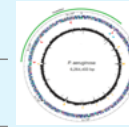
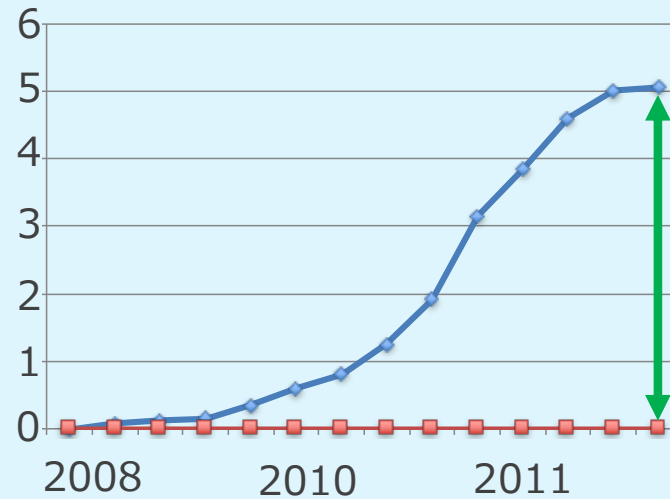
Dry解析の限界とスクリーニングの重要性

人類がこれまでに培養できた
微生物**0.02%** 未満

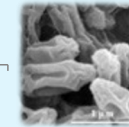


未培養・難培養微生物
99.98% 以上

微生物株数 ($\times 10^6$)



DB上：
500万株以上



単離株：
約1万株

微生物ゲノム情報と単離微生物とのギャップ

バイオインフォマティクス

活性・機能予測

微生物を培養して得られるデータの不足

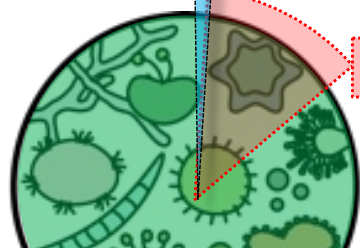
→ **Dry解析の限界**

活性・機能スクリーニングは絶対に必要

- 環境微生物の培養 (可培養化)
- 活性・機能スクリーニングが必須

100万検体の“ミリオン”スクリーニングの必要性

単離・培養可能微生物
1% 未満



有用微生物

未培養・難培養微生物
99% 以上

標的遺伝子	由来	全検体数	陽性検体	陽性率 (/100万検体)
抗生物質耐性	土壌	1,186,200	10	8
キチナーゼ	海水・汽水	825,000	11	13
エステラーゼ	土壌	60,000	1	17
リパーゼ	土壌	1,016,000	4	4

(Microbes and Environments 21 (4), 201-215 (2006)より抜粋)



最低限必要なスループット：100万 検体

既存の培養・スクリーニング法

10万検体ライブラリ

23枚 (48 検体 /well)

培養・スクリーニング

陽性検体 8

4人で3ヶ月

ミリオンスクリーニング法

100万検体ライブラリ

100μL (1検体 /1ドロプレット)

培養・スクリーニング

陽性検体 80

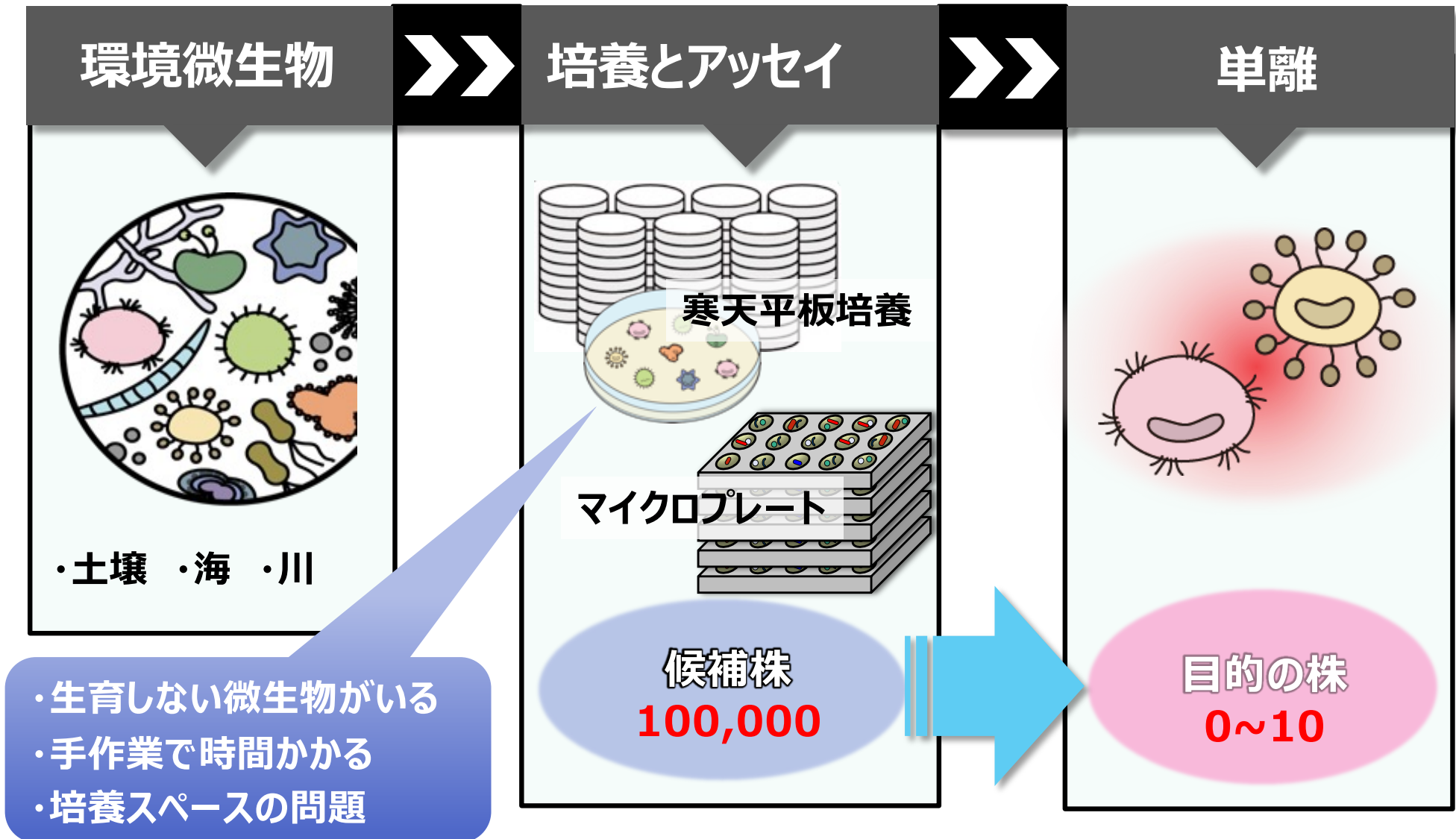
1人で数日 (作業時間)

サンプルに含まれる有用微生物を
全て探索する



- 未培養・難培養微生物の培養
- 100万検体以上のスループット

現在のスクリーニング技術の限界



様々な微生物に対応かつハイスループットな
スクリーニング技術が求められている

課題の明確化

スクリーニングの限界



培養

検出系

スループット

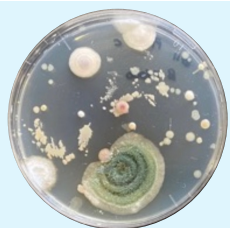
に課題

培養

未培養/難培養微生物の培養化が困難



他の微生物が生産する物質（生育因子：シグナル物質や栄養）
→**休眠からの覚醒が必要**



増殖が早い菌ばかりとれ、生物資源が偏る
→**増殖の遅い菌の取得が必要**

培地成分
固体/液体
pH、温度、気相

多様な培養条件の検討が必要
→**条件の組み合わせ + ハイスループット性 必要**

検出系

スループット

古典的技術

新しい技術

検出系

○ 豊富

× 限定（蛍光）

両立できていない


スループット

× Low

○ High

ミリオンスクリーニング技術 (1/3)

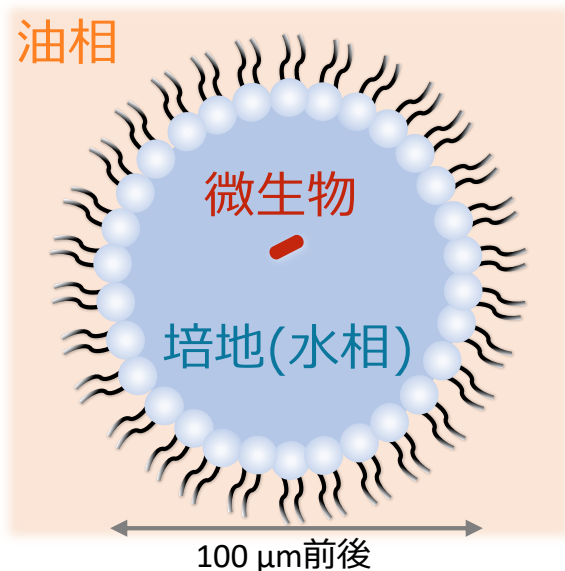
ドロップレットを活用したハイスループットスクリーニング技術

- 既存のセルソーター： 1細胞 解析
-  **ドロップレットスクリーニング**：培養器 (フラスコのような) ごと 多細胞・生産物 解析

スクリーニングに用いるドロップレット

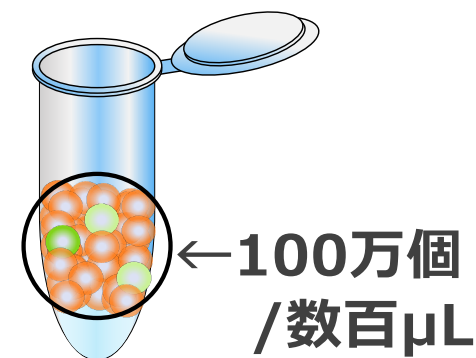
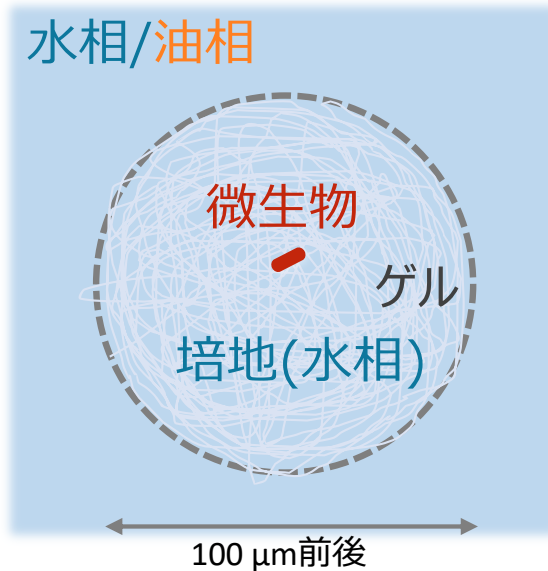
WODL

(Water-in-Oil DropLet)



GMD

(Gel MicroDroplet)

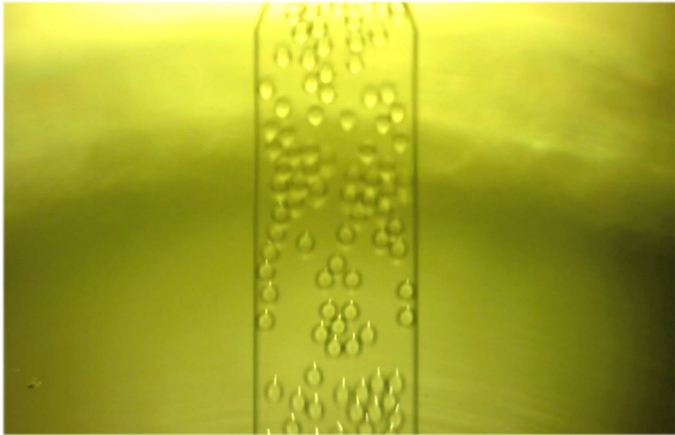


ドロップレット (培養器) : 「区画化」

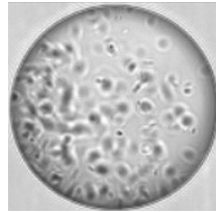
ミリオンスクリーニング技術 (2/3)

ドロップレット封入・生成

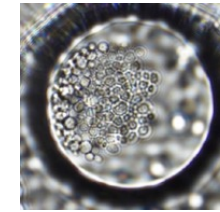
(100万個/数分)



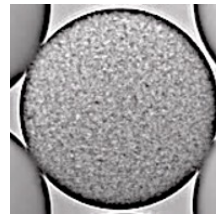
単離株の培養例



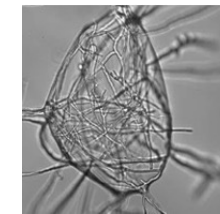
大腸菌
Escherichia coli



油脂生産酵母
Rhodosporidium toruloides

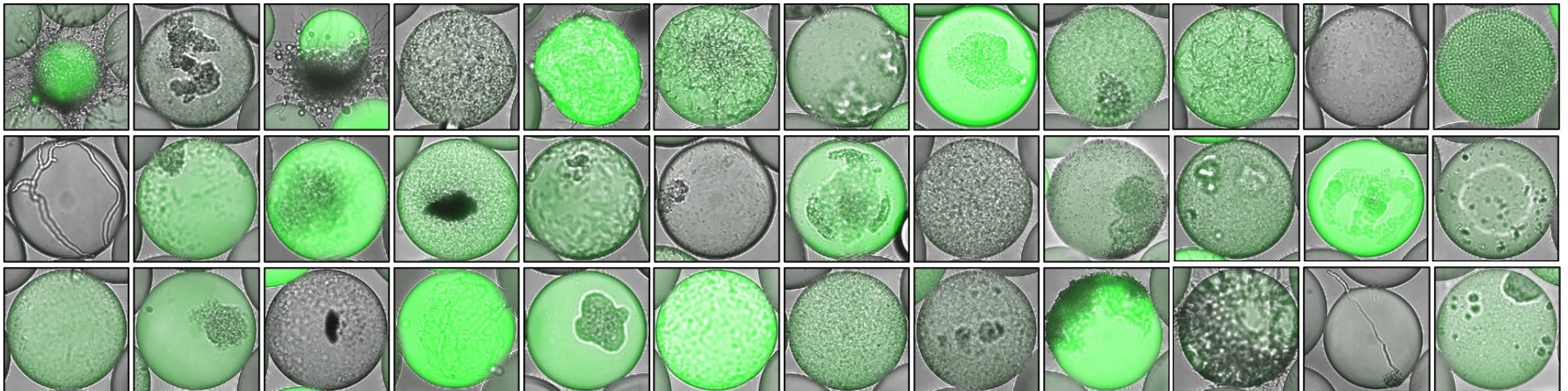


ペプチダーゼ生産細菌
Pseudoxanthomonas mexicana



セルラーゼ生産糸状菌
Trichoderma reesei

土壌環境微生物・ペプチダーゼ活性



ミリオンスクリーニング技術 (3/3)



環境微生物

スクリーニング対象

ミリオンスクリーニング

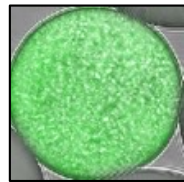
↓ ドロップレットに封入

↓ 微生物培養



増殖可能微生物

↓ 活性機能で分離



陽性微生物

培養

検出系

スループット



有用微生物

- 有用宿主
- 遺伝子資源保有

目指す技術

培養

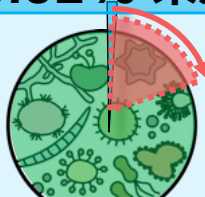
検出系

スループット

の課題

社会・企業のニーズに応える

人類が培養可能な微生物
0.02% 未満



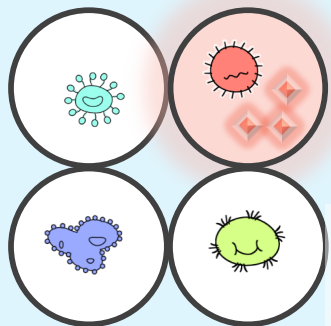
探索範囲
拡大

1. 対象微生物「拡大」

未培養・難培養微生物
99.98% 以上

基盤技術開発 ▶

可培養化



生育
比色

2. これまでの検出系を取り入れる

基盤技術開発 ▶

検出系拡充



100万～1000万/1日

3. ウルトラ-ハイスループット

基盤技術開発 ▶

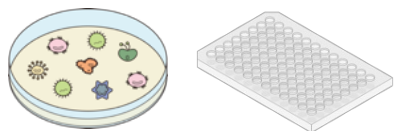
自動化

- 1000倍以上効率化
- 世界最高のスクリーニング技術の提供

ここまでのまとめ

これまでのスクリーニング

古典的スクリーニング



- 寒天平板培養
- マイクロタイタープレート

自動化

- 実験ロボット

- ◎ 検出系豊富
- × 未培養/難培養
- × 低効率

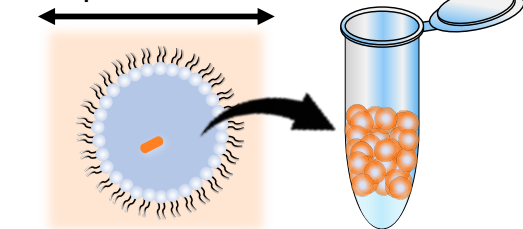
培養可能微生物のみ

単離・培養可能微生物
0.02%

本PJ (ミリオンスクリーニング)

従来のドロップレット培養スクリーニング技術

100 μ m (0.1 mm)



- ◎ 高効率
- × 検出系不足 (主に蛍光)
- × 汎用的でない (手作業)

本PJで実施する項目

可培養化

検出系拡充

自動化

情報・
微生物格納

未培養・難培養微生物
へもアプローチ

未培養・難培養微生物
99.98%

バイオものづくり研究開発における位置づけ

□ 背景とミリオンスクリーニング技術の特徴

□ 基盤技術開発

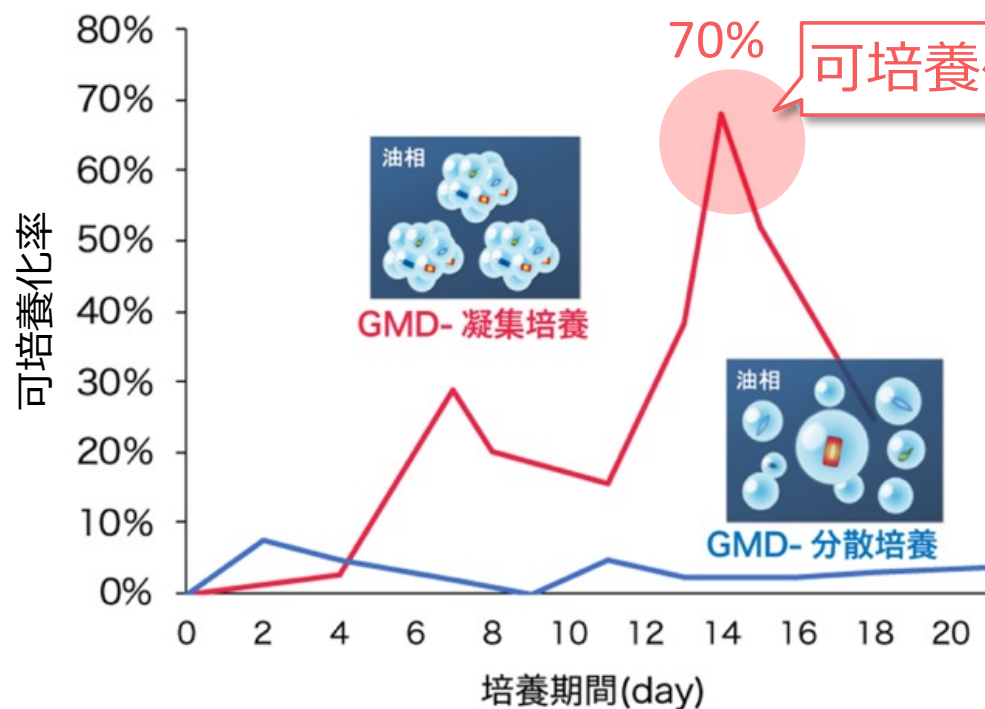
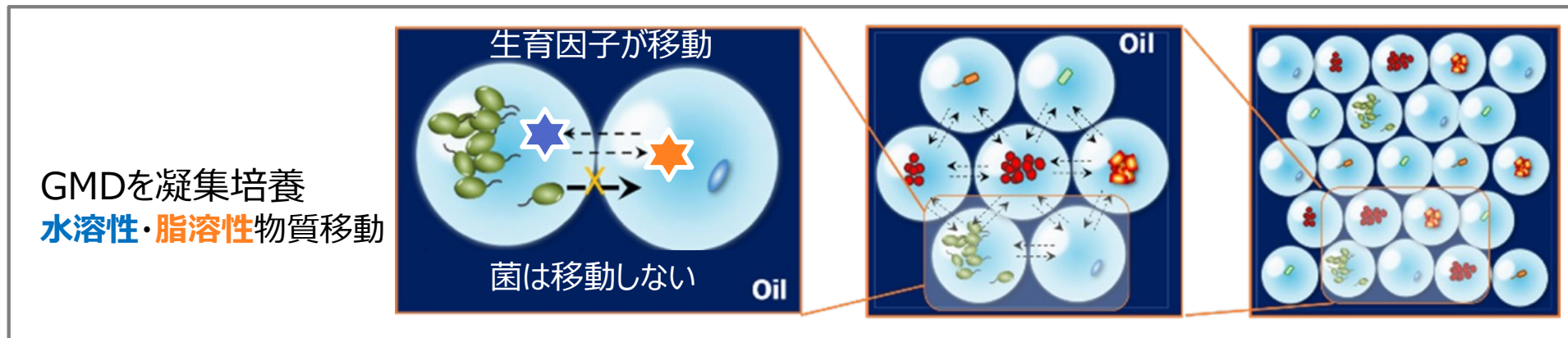
□ スクリーニング事例：①育種株の評価

□ スクリーニング事例：②環境微生物探索

□ まとめ

環境微生物の可培養化率向上

微生物間相互作用を促進する新規手法（GMD凝集培養）を構築

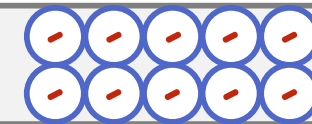


可培養化が促進

**世界最高の
可培養化率(70%)*** 達成
これまでの手法・常識では**数%**程度

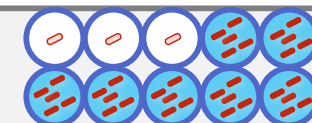
*微生物増殖ドロップレット数 / 全ドロップレット数

1ドロップレットに
1細胞封入



↓ 培養

増殖ドロップレット
カウント (7/10=70%)

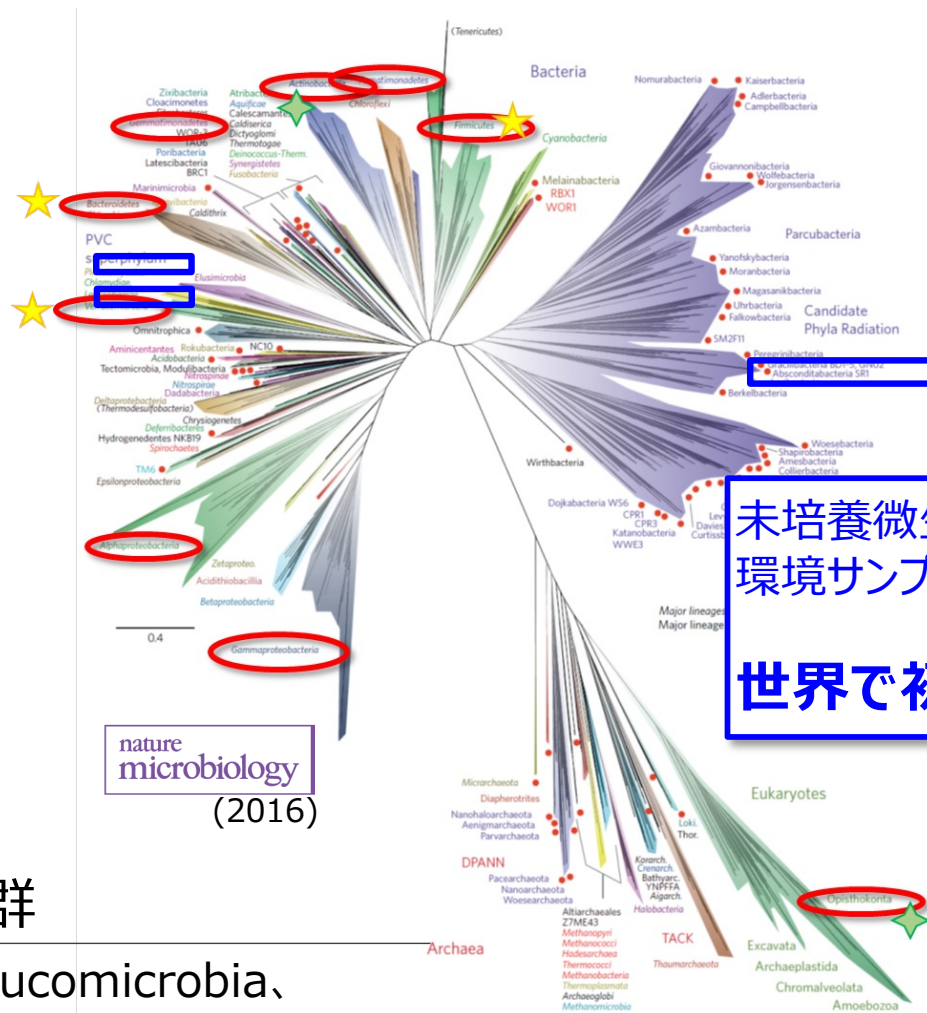


難培養微生物系統を可培養化

本事業内で可培養化

○ WODL培養

□ GMD培養



未培養門 SR1

未培養微生物
環境サンプル：DNAレベルでのみ確認
世界で初めて「培養」に成功

獲得に成功した微生物群

- 難培養微生物群 Verrucomicrobia、Bdellovibrionota、Planctomycetes
- 新規微生物候補株 10株以上獲得

■ 圧倒的な可培養化

■ 未培養微生物を培養化

▶ 対象微生物：「広域」

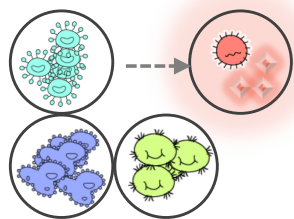
増殖速度が遅い微生物を選択的に獲得

従来技術

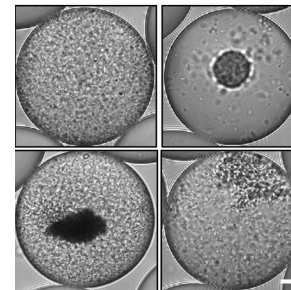


増殖が早い菌（存在率が多い）が優先して生育

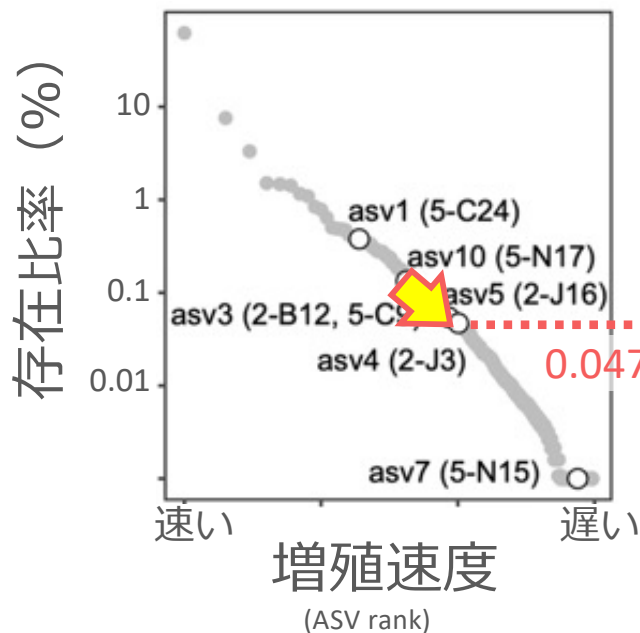
本技術



増殖が遅い（存在率少）、従来と異なる有用微生物が単離可能になる



増殖検出技術保有
RNase検出



存在比率 **0.05%以下**
生育の遅い菌の単離

▶スクリーニング対象：「広域」

シングルドロップレット分注機を実用化

従来技術

ソーティング後



数百～数千個程度

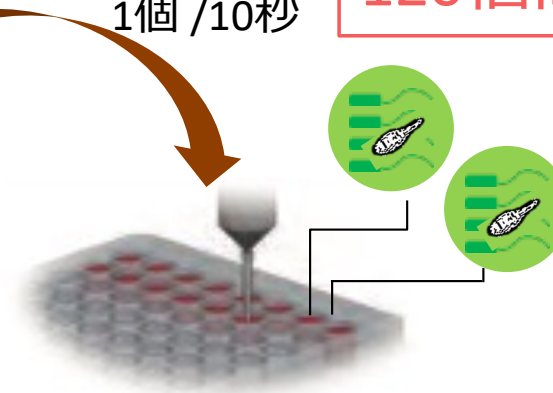
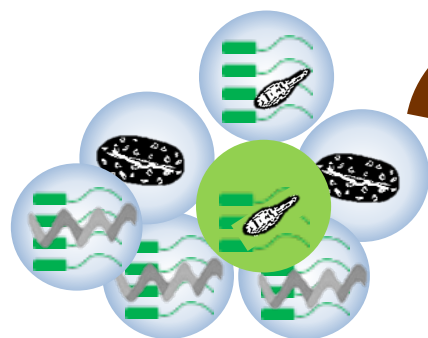
ポジティブWODL：数百～数千個のプール

- ・手作業でわかる（1個 / 20分）
- ・まとめてドロップレットを壊してプレートで培養



【On-chip Droplet Selector】

ポジティブ WODL を
1つずつを回収・分注
1個 / 10秒



ボトルネックを解消して
120倍高速化

■ 製品化



誰にでも 多種の微生物を回収可能

バイオものづくり研究開発における位置づけ

- 背景とミリオンスクリーニング技術の特徴
- 基盤技術開発
- **スクリーニング事例：①単離株の育種**
- スクリーニング事例：②環境微生物探索

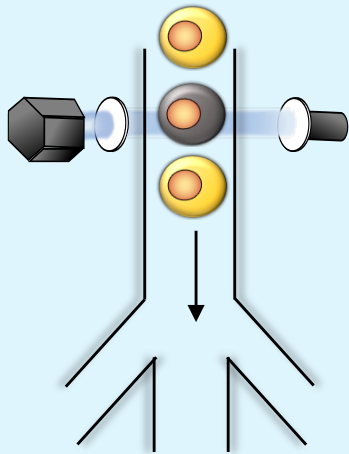
従来技術では困難な生産性・増殖能に基づく育種

モデル物質：油脂



- 生産性も高く、増殖能も高い菌が欲しい
- 増殖能に関する遺伝子資源が欲しい

セルソーター



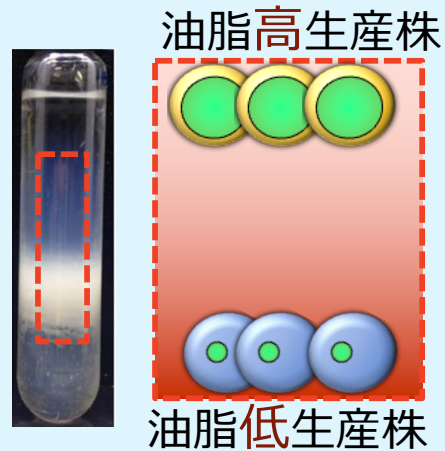
可能

• 油脂量評価

不可

• 増殖能評価
• 多様なクローン

密度勾配遠心法



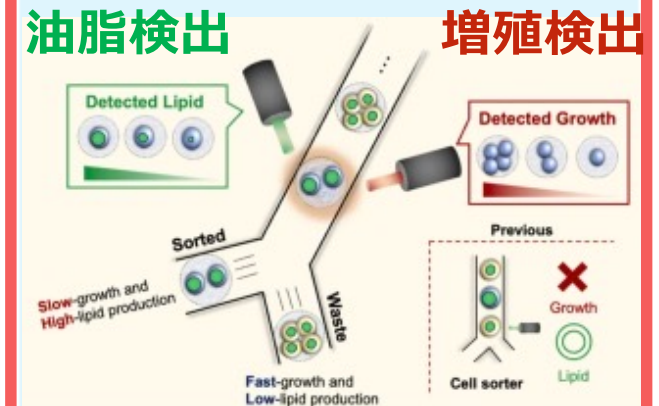
可能

• 油脂量評価

不可

• 増殖能評価
• 多様なクローン

ドロプレット法



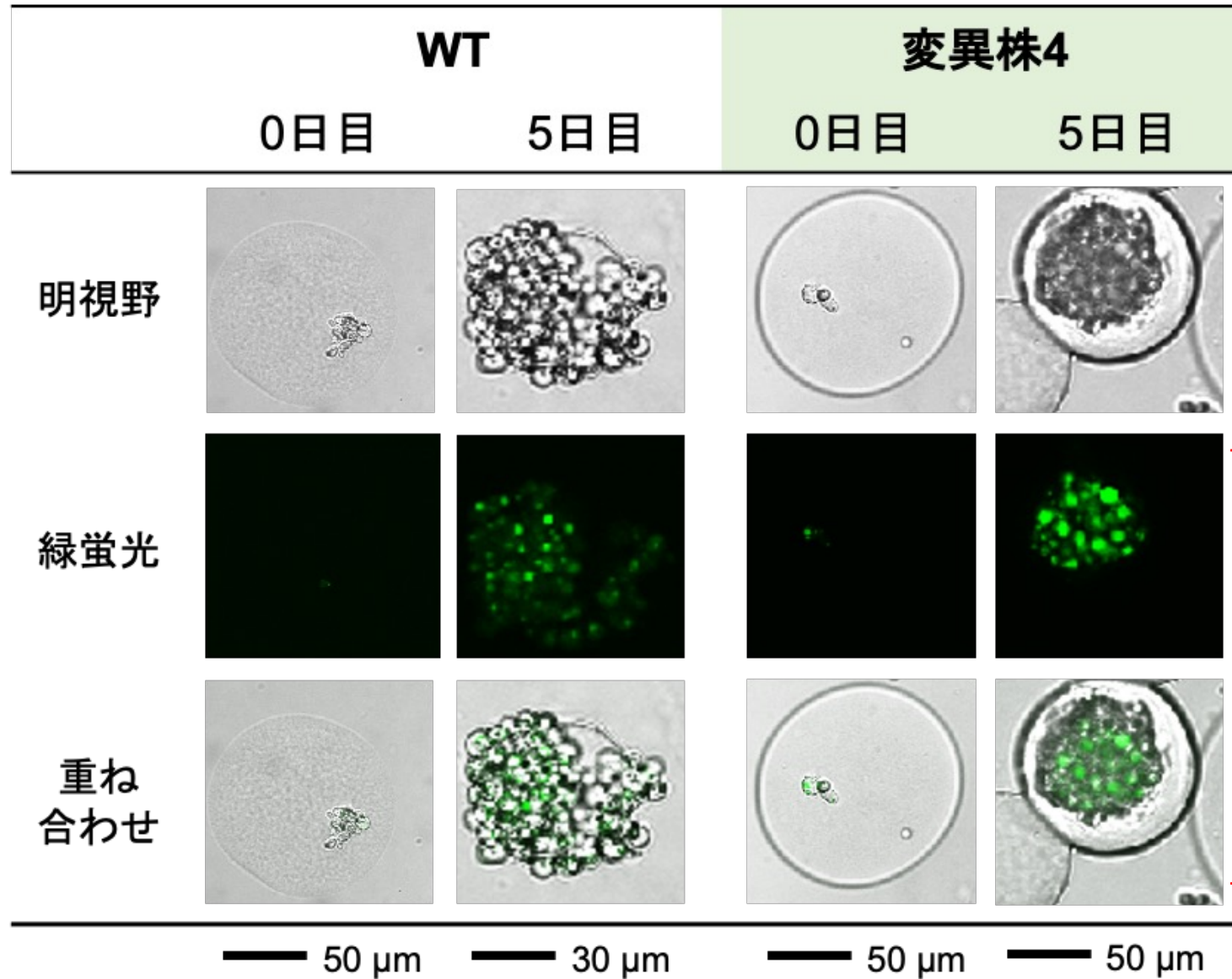
可能

• 油脂量評価

• **増殖能評価**

• 多様なクローン

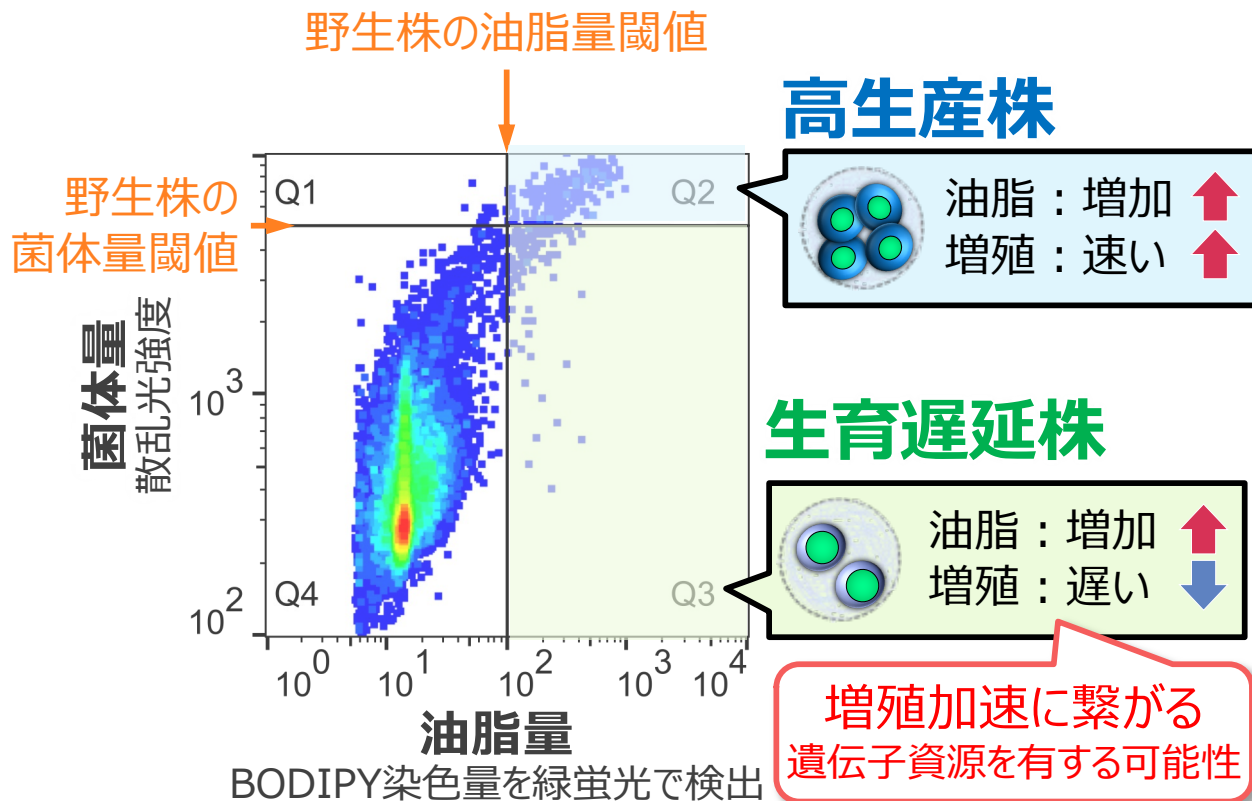
生産性によって分離可能



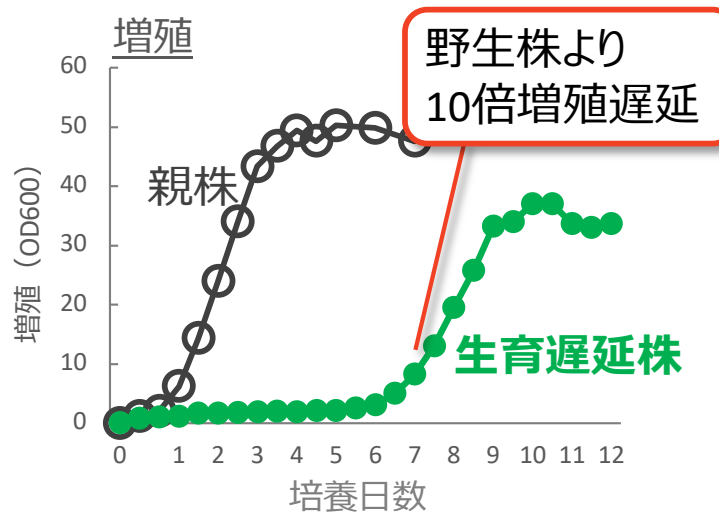
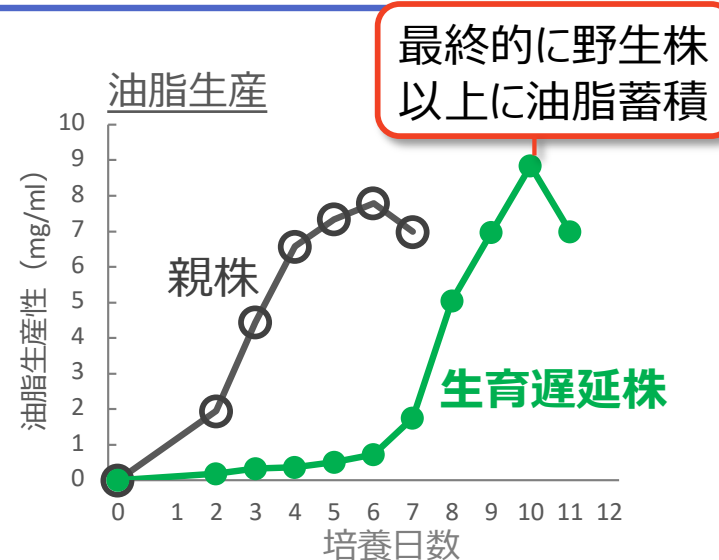
WTよりも緑蛍光
強度が高い

培養5日目で優位な差

高生産株・生育遅延株のスクリーニング



Using gel microdroplets to develop a simple high-throughput screening platform for oleaginous microorganisms, Y. tanaka et al, *Journal of Biotechnology*, in press(2022)



油脂生産性と生育能スクリーニングに成功

高生産株 4株

菌株の特徴: 油脂生産性 **30%** ↑
遺伝子資源: 脂肪酸合成・糖質代謝 遺伝子

生育遅延株 6株

菌株の特徴: 増殖 **10倍遅延** ↓ + 油脂生産性 ↑
遺伝子資源: 成長関与 遺伝子

検出系拡充

物質生産性-生育能の2軸スクリーニングを実証

バイオものづくり研究開発における位置づけ

- 背景とミリオンスクリーニング技術の特徴
- 基盤技術開発
- スクリーニング事例：①単離株の育種
- **スクリーニング事例：②環境微生物探索**

新奇油脂生産微生物の探索

・これまでと組成の違う油脂

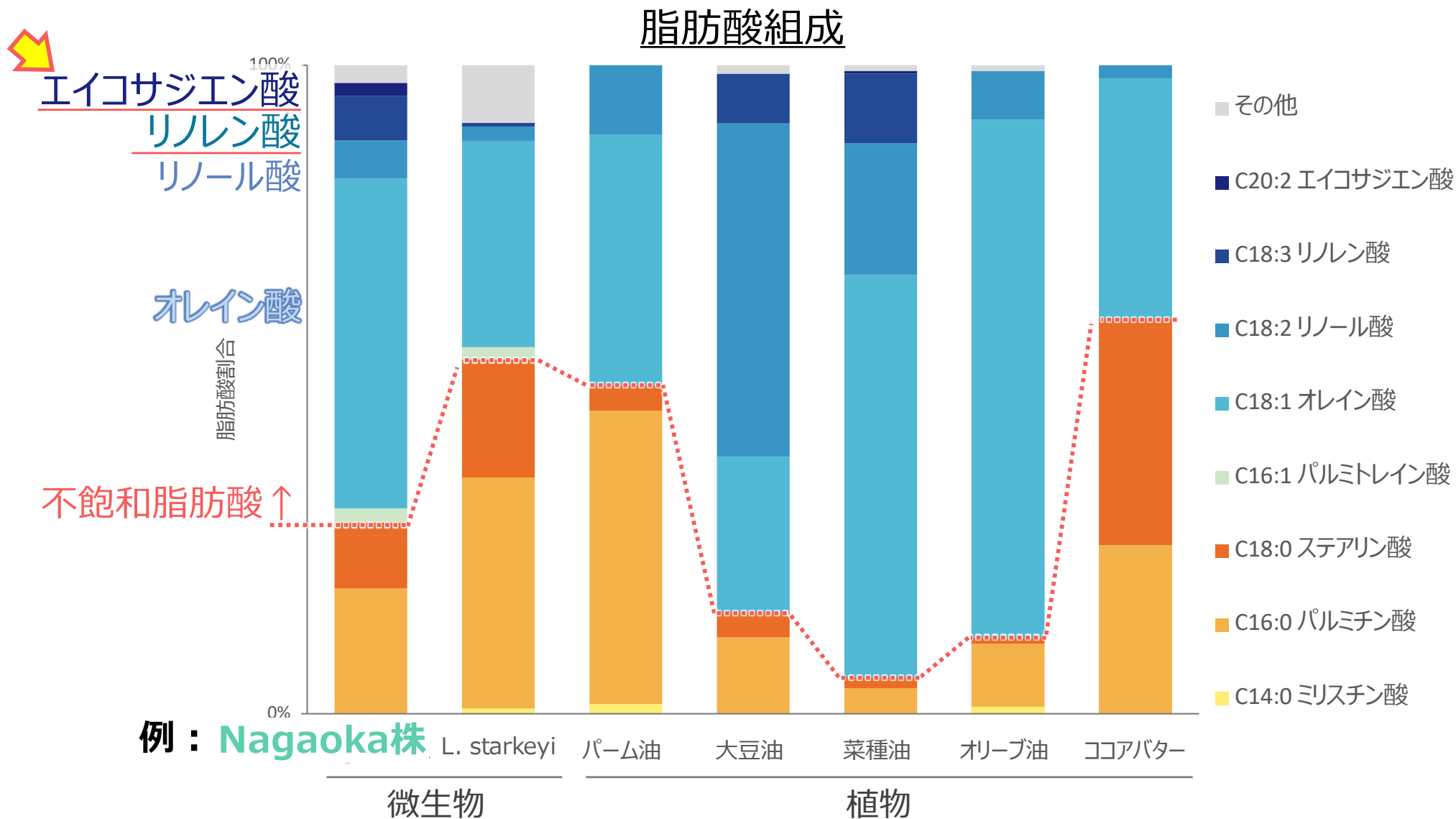
・不飽和度が高い油脂

(宿主・遺伝子資源)



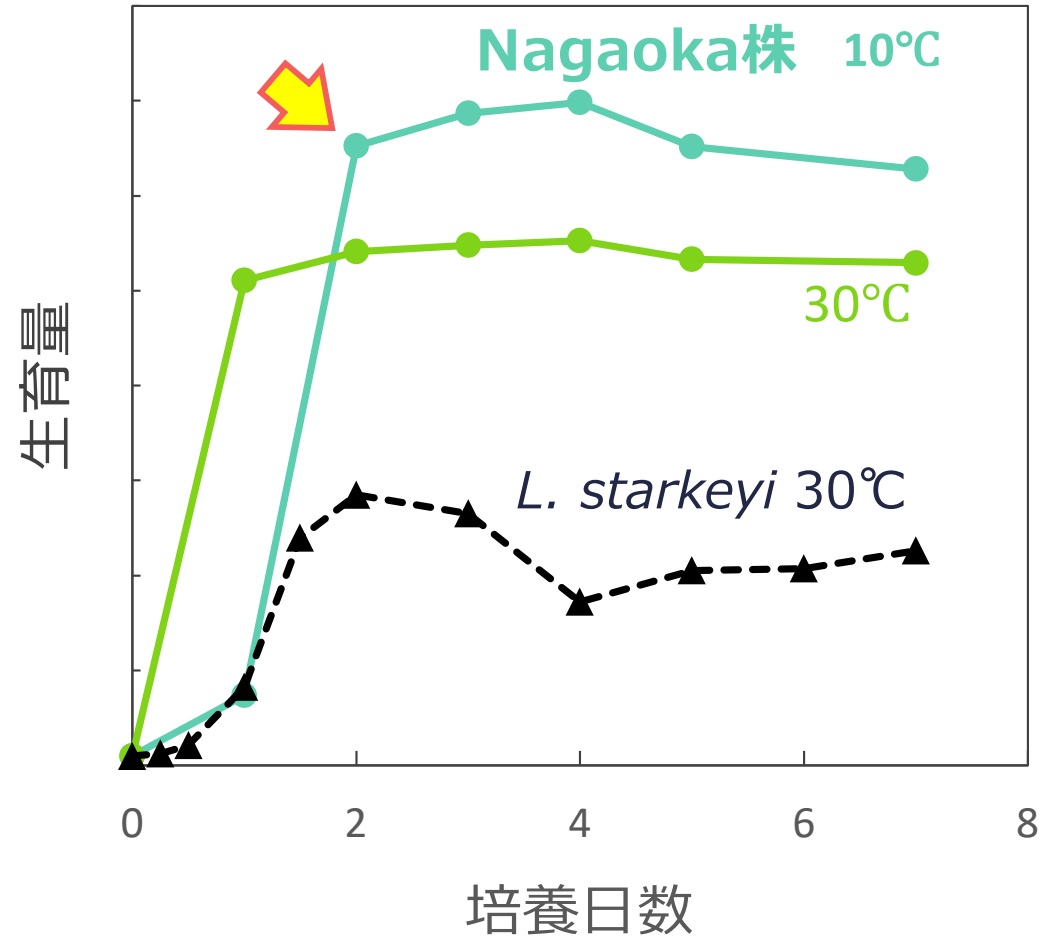
不飽和脂肪酸含有量が多い菌株を単離

不飽和度が高い油脂生産菌を探索 **油脂生産微生物候補株 37株取得**



■ **Nagaoka株** : 不飽和脂肪酸が多い (リノレン酸・エイコサジエン酸)²⁴

Nagaoka株の生育速度 (1/2)



■ Nagaoka株 : 低温でも高い増殖能力

Nagaoka株の生育速度 (2/2)

L. starkeyi

0:00:00.000



Nagaoka株

0:00:00.000

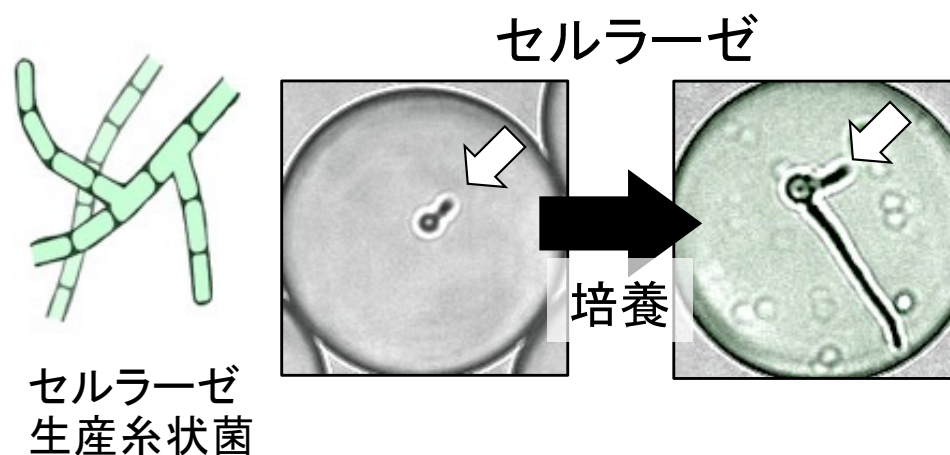
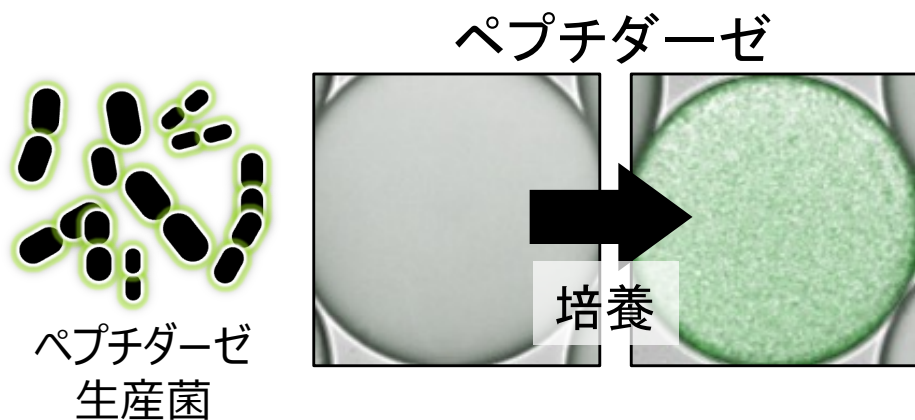


■ Nagaoka株は 増殖速度が極めて早い

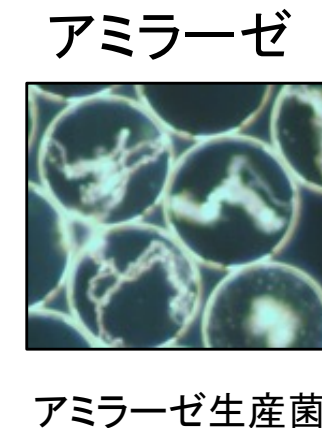
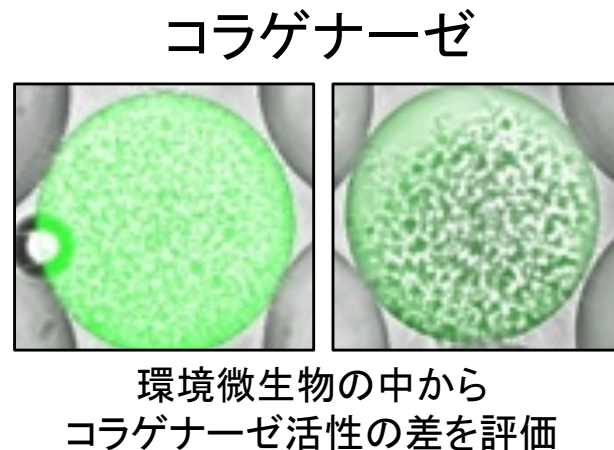
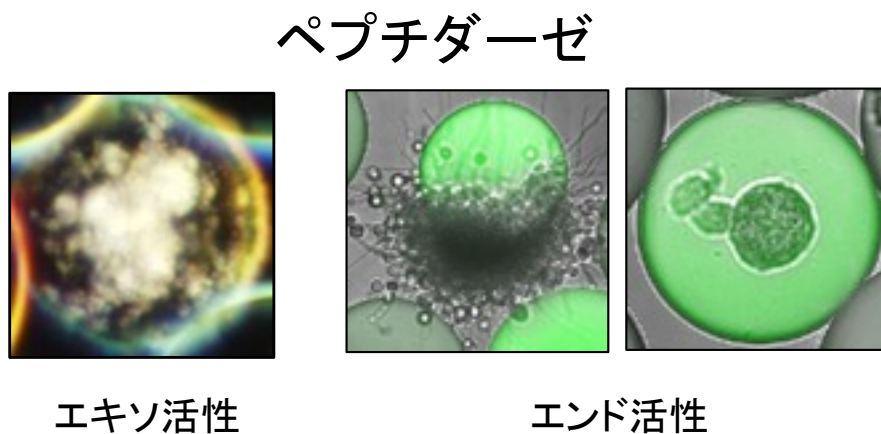
その他の活性検出の事例

蛍光に基づいて酵素活性を検出し、微生物スクリーニングを実証

選抜株 (スマートセルなど)



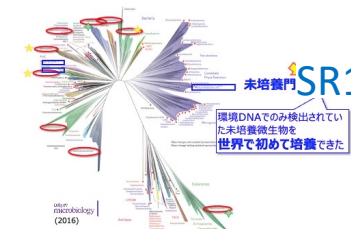
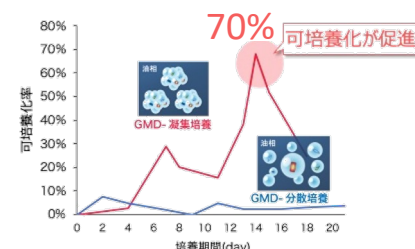
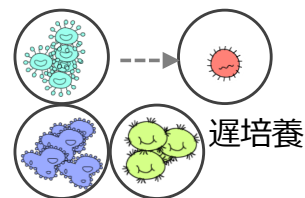
環境微生物



その他の活性検出の事例

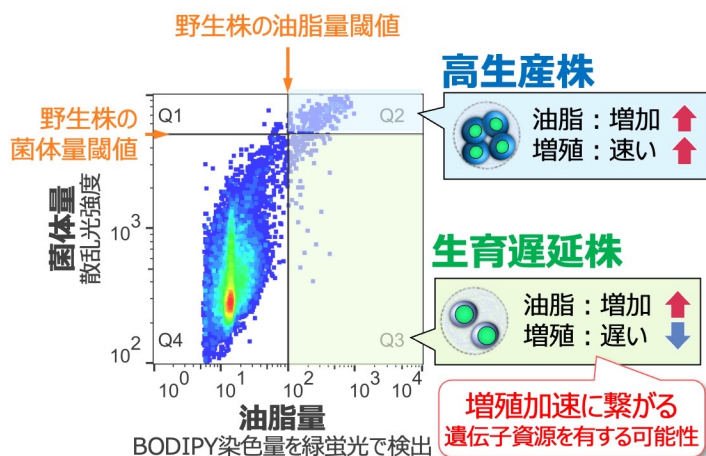
基盤技術開発

- 未利用微生物へのアクセス基盤技術
- 生育が遅い微生物に対応
- 単離回収を120倍効率化

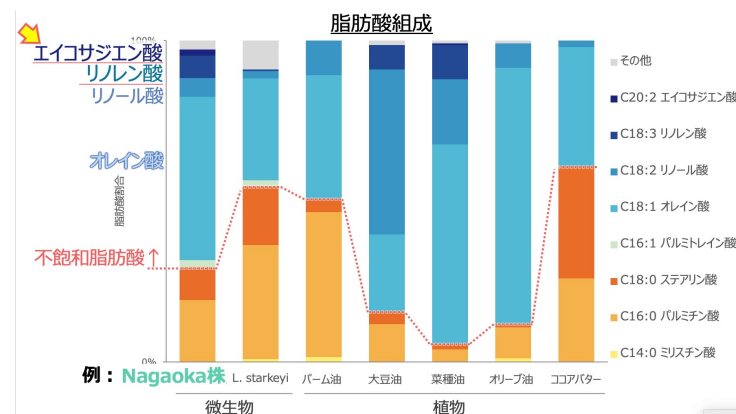


開発技術の実証

- 生産性×増殖能 2軸

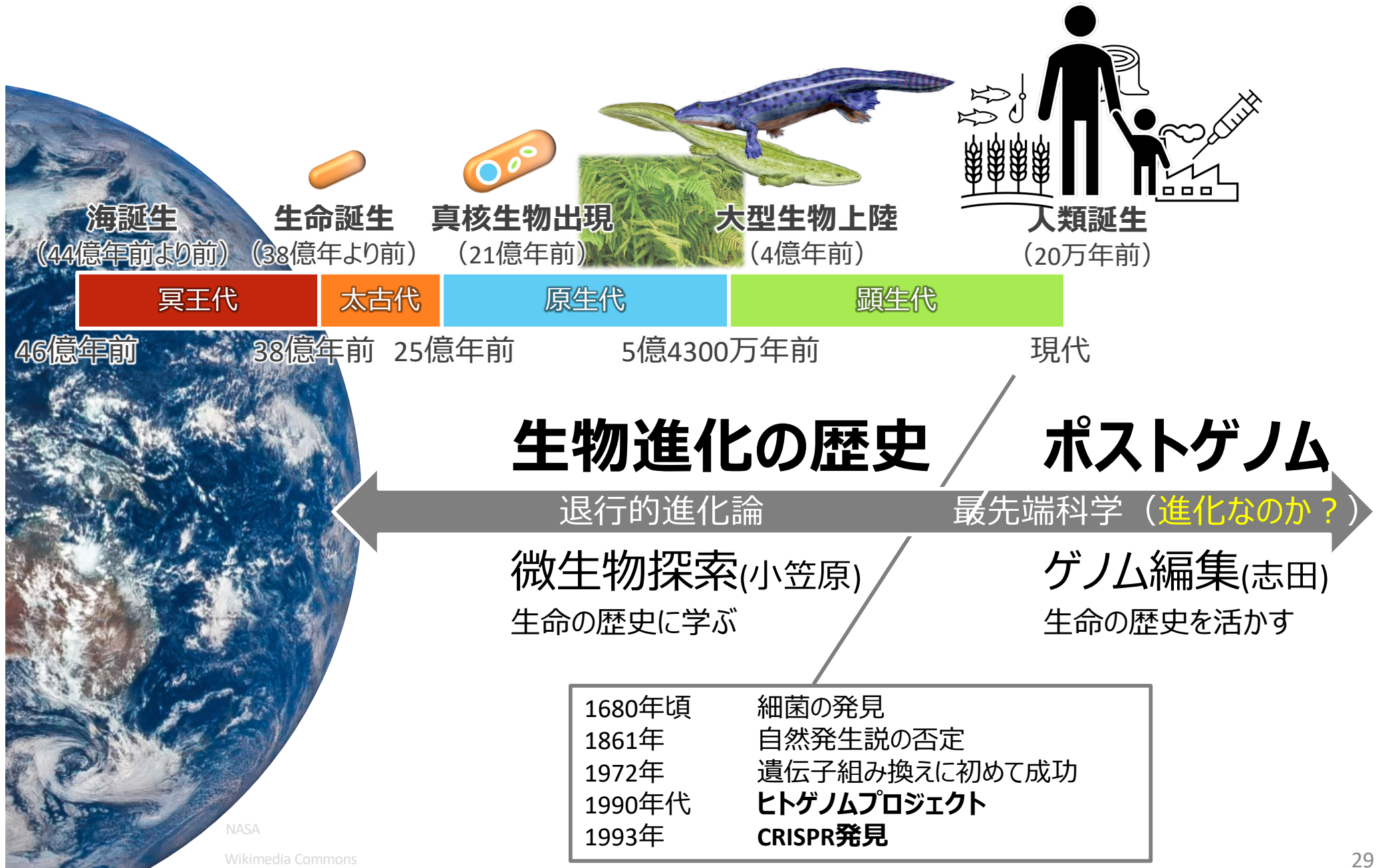


- XXXXXXXXXXXX
(不飽和脂肪酸生産 Nagaoka株)



退行的進化論・謙虚に学ぶ

(稲作農家さんの匠の技・田んぼを微生物培養器としてとらえている)



**本プロジェクトでは菌体内/外の酵素・物質、代謝経路/産物を対象としたスクリーニング技術を構築します。
ご興味のある方はお声がけください。
(長岡技科大・小笠原渉：
owataru@vos.nagaokaut.ac.jp)**