

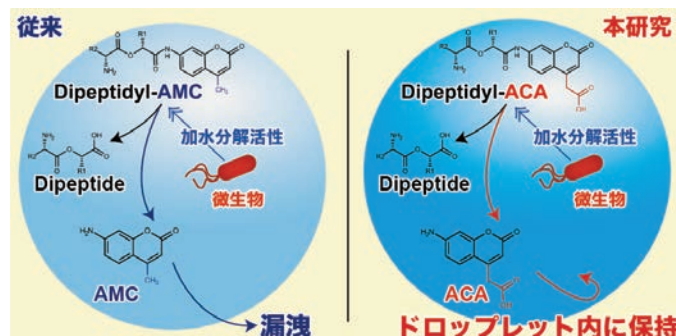
ドロップレットを用いた超高効率な微生物スクリーニングのためのクマリン系基質の開発

Development of Coumarin-based Substrates for Ultra-high Throughput Droplet-based Screening of Microorganisms

○中村 彰宏¹、鈴木 義之¹、志田 洋介¹、津田 裕子²、日高 興士³、小笠原 渉¹ (¹長岡技科大・工、²神戸学院大・薬、³神戸大・研基セ)

○Akihiro NAKAMURA¹, Yoshiyuki SUZUKI¹, Yosuke SHIDA¹, Yuko TSUDA², Koushi HIDAKA³, Wataru OGASAWARA¹ (¹Nagaoka Univ. of Tech., ²Kobe Gakuin Univ., ³Kobe Univ.)

ドロップレットとマイクロ流体デバイスを組み合わせたスクリーニング技術は、超高効率な生化学的アッセイや微生物探索のツールとして注目されている。特にフッ素系オイルを油相に用いた容積 nL～pL 程度の w/o ドロップレットは、液体内で微生物培養、酵素反応の場として利用されている。w/o ドロップレットは界面活性剤で区画化されているため、内部に含まれる物質の特性によってはドロップレット間を移動することがある。この現象はドロップレット内部で酵素反応を行い検出する際に障壁となり得る。例えば、ペプチダーゼ/プロテアーゼなどの様々な蛍光基質に用いられるクマリンの誘導体 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) は、高い疎水性から w/o ドロップレット内部から外へ漏洩する。そのため、w/o ドロップレットを用いたスクリーニング技術において、AMC は使用されてこなかった。本研究では w/o ドロップレットから漏洩しない、クマリン系化合物を探索し、新規基質を開発した (右図)。加えて、開発した基質を用いて毎秒 100 ドロップレット以上の速度で 16 万個の液滴をスクリーニングし、環境中からペプチダーゼ活性を有する微生物を獲得することで、その有用性を確かめた。本研究により w/o ドロップレットを用いたマイクロ流体システムにおいて、検出可能な酵素種を大幅に拡大することに成功した [1]。



Droplet-based microfluidic systems are a powerful tool for biological assays with high throughput. Water-in-oil (w/o) droplets are typically used in droplet-based microfluidic systems to culture microorganisms and perform enzyme assays. However, because of the oil surrounding the nanoliter and picoliter volumes of w/o droplets, availability of suitable substrates is limited. For instance, although 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) is commonly used as a fluorescent probe of the substrate to detect peptidase activity, AMC leaks from w/o droplets to the oil phase due to its high hydrophobicity. Thus, AMC substrates cannot be used in droplet-based microfluidic systems with w/o droplets. In this study, we searched for coumarin compounds that do not leak from w/o droplets and developed substrates. Since novel substrate could be applied to various substrates as a fluorescent probe, detectable microbial enzyme activities for droplet-based microfluidic systems can be largely expanded [1].

[1] A. Nakamura et al., *Anal. Chem.*, **94** (5), 2416–2424, 2022.

この成果の一部は、NEDO の委託業務 (JPNP20011) の結果得られたものです