

セルソーターMA900 出芽酵母の生死判定・ソーティング

背景：フローサイトメーターは個々の細胞を高速に解析できるツールとして幅広い分野で利用されている。近年では、医薬品や化粧品等への応用に有用なタンパクを合成するアミング酵母が開発されるなど、酵母に関心が集まっており、そのなかで生育能力の高い酵母をクローニングする目的で、セルソーターを活用するケースもある。本アプリケーションシートでは、セルソーターMA900を用い、酵母の生死判定、及びソーティングした結果について紹介する。

サンプル・装置：

- ・出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- ・生死判定試薬: LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit, for flow cytometry (Thermofisher L34856) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/jp/ja/L34856>
- SYTO9 : 3.34 mM/ PI : 20 mM
- ・寒天培地/液体培地 (20g/L Peptone, 10g/L Yeast Extract, 2% Glucose, 寒天培地のみ 20g/L Agar添加)
- ・セルソーターMA900

方法・結果：出芽酵母を 5.0×10^6 cell/ml程度に調整し、SYTO9とPI試薬を酵母希釈液1mlに1 μ Lずつ添加し、室温にて15分間インキュベート後、セルソーターMA900で測定した。その後、生菌のみをソーティングし、生菌が回収されているかを、寒天プレートにソート、および3日間 30°Cで培養することで確認した。

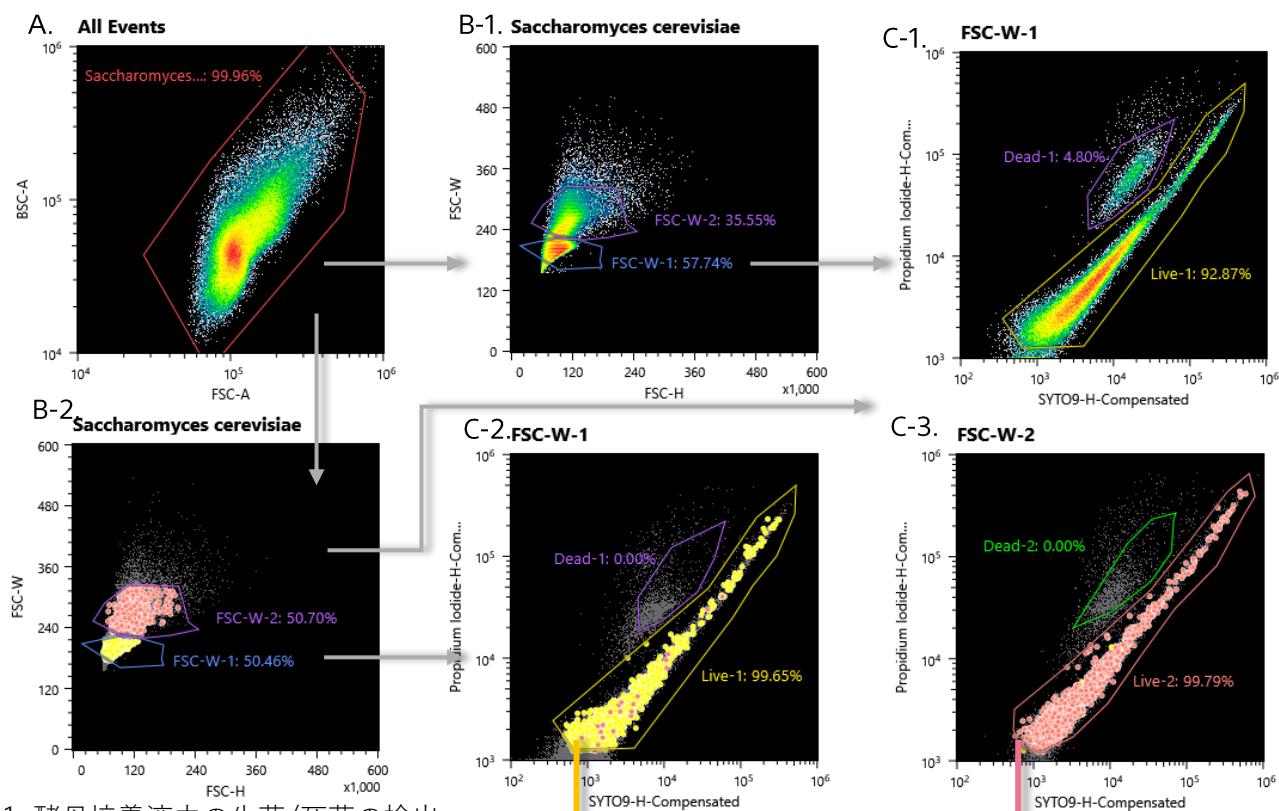


図1. 酵母培養液中の生菌/死菌の検出
A. FSC/BSCプロットで、酵母分画をゲーティング

B1,2. FSC-H/FSC-Wプロットで、大きさの異なる分画 (FSC-W-1/FSC-W-2) をゲーティング

C1-3. およびD. FSC-W-1/FSC-W-2

それぞれの、SYTO9/PIプロット。

生菌のみプレートソーティング※1

(プレート左半分：シングルセル / プレート右半分：コントロールとして、1スポットにつき複数細胞ソーティング)

※1. SYTO9は生菌/死菌共に染色し、PIは死菌のみ染色したうえで、共存するSYTO9を減光させるため、プロット上 生菌が右側、死菌が左側に現れる。詳細はBacLightキットのマニュアルをご確認ください。

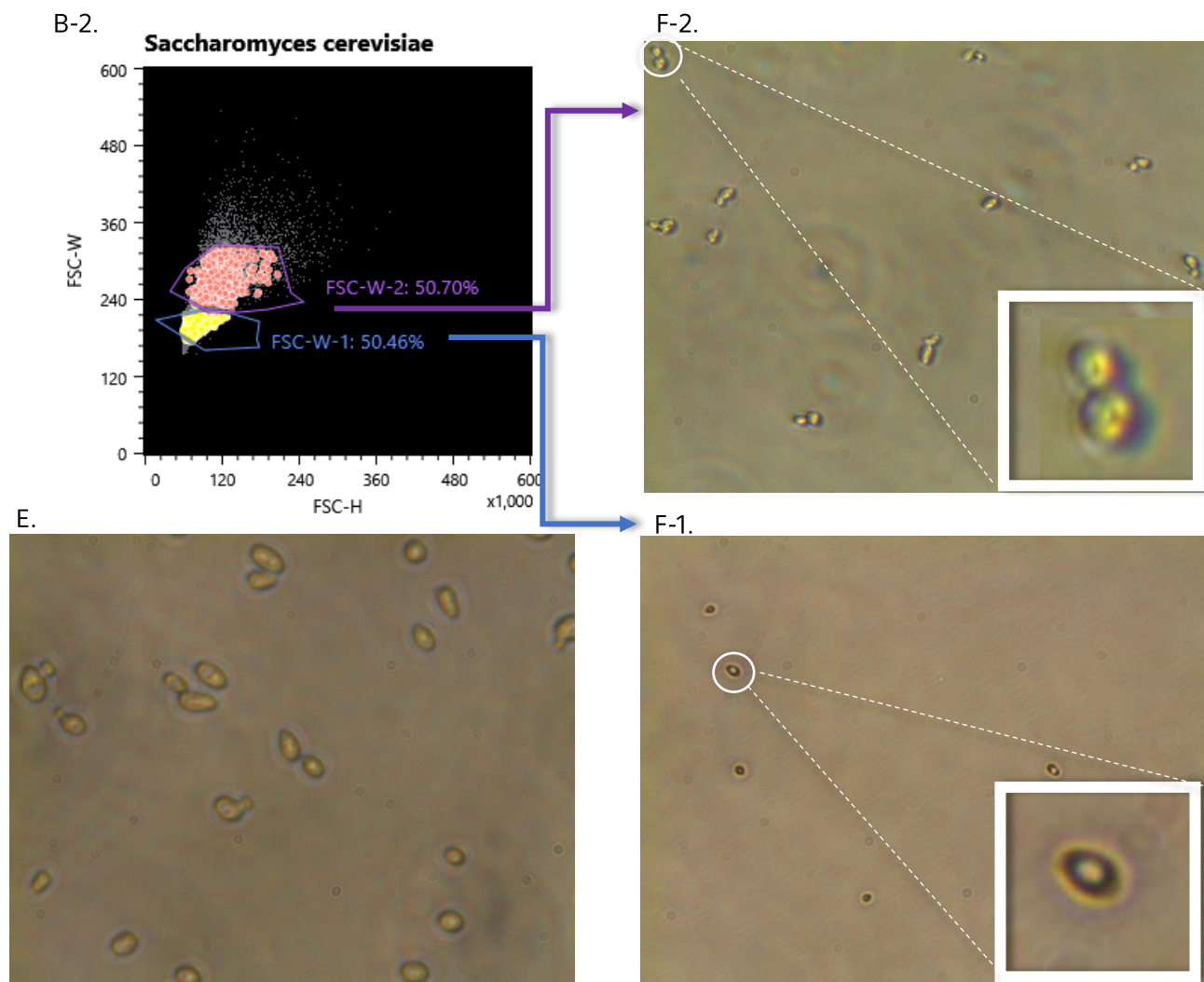


図1 補足. 酵母の形態観察

E. ソート前の懸濁液中（培養液）に含まれる酵母を光学顕微鏡（×400倍）にて観察

F-1,2. FSC-W-1/FSC-W-2分画をチューブソートした後、それぞれの分画で見られた酵母の形態（×200倍）を観察、その拡大を同時に示している

結果

図1 C-1.のように、酵母培養液中に含まれる生菌、死菌を検出した結果、約4.8%程度の死菌が含まれていた。その中から生菌のみを寒天プレートにソーティングし、3日間培養した結果、図1 D.のように、コロニーを形成することに成功し、シングルセルソートにおいても48ウェル中41ウェル（約85.4%）においてコロニーが確認できた※2。また、図1補足 F-1, 2.から、FSC-Wが小さい値の集団（FSC-W-1）では、比較的小さい径の、出芽の進行段階が初期にあると考えられる酵母が多く、一方、FSC-Wが大きい値の集団（FSC-W-2）では、出芽の進行段階が比較的前進した酵母が濃縮できていることが示唆された。

以上から、出芽酵母のような比較的小径のサンプルでもソニーMA900では検出が可能であり※3、生死判定を行うことで高生存率で培養することができたといえる。また、フローサイトメーターの散乱光パラメータを活用し、出芽の段階の異なる酵母を特定することができたと考えられる。

※2.プレートにおいて、コロニーが形成されなかったごく一部のスポットには、SYTO9のもつ毒性が影響した可能性がある。

※3. ソニーセルソーター SH800Sでも、同実験系（酵母散乱光検出・生死判定・再培養）で同様の結果が得られることが確認されています。検証時 SH800Sユーザー様にご協力いただきました（Data not shown）。

ソニーセルソーターSH800Sでの同実験にご協力いただいた
ユーザー様 インタビュー

株式会社 バイオエックス

高田 慎一 様



ー貴社のライフサイエンス事業について、事業内容をご教示ください。また、貴社ではバイオセンサーを開発されているかと存じますが、そのご活用例や、最終的にはどのような用途で社会に貢献することを期待されていますか。

バイオエックスでは、少量の液量でpHの変化を高感度に検出できるバイオセンサーを開発しております。この高感度pHセンサーを活用して、食品分野の分析や環境分析で社会に貢献できるようにしたいと考えております。酵母や常在菌も、バイオセンサーの検出対象として可能性があると考えており、酒造会社様や化粧品メーカー様にも、品質管理や迅速検査などの観点から貢献できると嬉しいです。

ー弊社フローサイトメーターは、どのような用途でバイオエックス様のご研究にお役立ていただけそうですか。また、現時点での使用感に関する印象等あれば、ぜひお教えてください。

自社バイオセンサーの検査対象になりうる微生物の、pHなど環境に対する感受性・その他性質を探りたいです。その点、今回のようなフローサイトメーターを使った解析ノウハウ自体が役立つと思っております。また、装置取扱いについては、チュートリアル動画が充実していて、操作がわかりやすいと感じております。当社のバイオセンサーデータと相関のとれるデータを、SH800Sで取得していきたいと考えております。

ー高田様 ご自身のバックグラウンドや、現職に就任されるまでの経緯について、お伺いしたいです。

大学・大学院時代は生物工学を専攻しておりました。細胞培養をしていながらその過程で遺伝子やタンパク質のプロファイルの変化を分析しておりました。細胞表層の糖鎖の変化を見るのにフローサイトメリーを用いて研究していました。当社は化学系が主体でしたが、ライフサイエンス系の大学に出向してライフサイエンスに関して学び、産学連携を通じてライフサイエンス事業に従事してきました。

セルソーターSH800S

全自動セットアップ・小型化を実現した“日本発”

セルソーター

セルソーターMA900

最大12色の蛍光同時検出と4方向ソーティングに対応

- ・96/384シングルセルソート(プレート対応モデル)
- ・細胞の種類やアプリケーション(生存率、速度)に合わせて最適なチップを3種類のオリフィスサイズ(70/100/130 μ m)から選択可能
- ・どなたでもすぐ使える全自動セットアップ



ー大変お忙しいなか、SH800での測定検証、
およびインタビューのご協力をいただき、
誠にありがとうございました。



発行元

ソニー株式会社

ライフサイエンス事業部

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

URL: <http://www.sony.co.jp/LS>