慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	人工酵素による高効率多段階反応系の構築と未利用バイオマス有効活用への展開
Sub Title	Construction of highly efficient multi-step reaction systems using artificial enzymes and their application for effective utilization of unused biomass
Author	土居, 信英(Doi, Nobuhide)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	酸化還元酵素を用いたバイオ電池は環境負荷が少ないエネルギー生産システムとして注目されているが、出力が低く寿命も短いため実用化には至っていない。そこで、進化工学による酵素の活性および安定性の向上に向けて、当研究室では、μTASを用いた酸化還元酵素の独自のスクリーニング系の開発が進められてきた。このスクリーニングシステムは 3 つのマイクロ流体デバイスからなる。まず、「区画化用デバイス」により、NAD(P)依存性酸化還元酵素とその遺伝子を固定した磁性ビーズを 1 個ずつ含むように区画化した酵素反応液を作成し、各区画内で独立に酵素反応を行う。次に、「検出用デバイス」により、ビーズ上の酵素活性により生じた各区画ごとのNAD(P)Hの酸化電流値を導電性ダイヤモンド（BDD）電極により自動連続測定する。最後に、誘電泳動を利用した「選別用デバイス」により、活性が高い酵素を固定しているビーズを含む液滴を選別・回収する。本研究では、このスクリーニング系を用いて、TCA回路を構成するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）の進化実験をおこなった。 まず、マイクロビーズディスプレイ法を用いて、IDH遺伝子を固定したビーズをエマルション内で無細胞転写翻訳し、酵素とその遺伝子を固定したビーズを作製した。その後、区画化デバイスによって作製された液滴内で酵素反応を行い、活性測定デバイスに内蔵されているBDD電極によって活性を測定できることを確認した。次に、誘電泳動を用いた選別デバイスにより回収したビーズに固定されているIDH遺伝子をPCRにより増幅することで、活性をもつIDH遺伝子を含む液滴を回収できることを確認した。最後に、error-prone PCRによってIDH遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、集団としての酵素活性が低下していることを確認した後、実際に誘電泳動を用いて選別実験を行った。その結果、選別した変異体ライブラリーでは集団としての酵素活性が回復したことから、我々のμTASによって活性を有する変異体酵素遺伝子をライブラリーから選別できることが確認できた。ライブラリー中のクローンの配列と活性を解析した結果、野生型よりも高い活性をもつ変異体も含まれていた。 Although biofuel cells using oxidoreductases have attracted attention as a power generation system with a small environmental burden, they have not been put into practical use yet due to problems of low output and lifetime. As means for increasing the activity and stability of enzymes, we focused on an evolutionary engineering approach through the development of microfluidic devices for high-throughput screening of oxidoreductases. Our μTAS are composed by three microfluidic devices. First, the encapsulating device makes compartments. One microbeads is encapsulated in each droplet, in which the enzyme reaction occurs. Second, the quantity of NADH in each droplet are detected by the NAD(P)H-measuring device that includes boron-doped diamond (BDD) electrodes. Third, we developed the dielectrophoretic sorting device for whole droplets that contained microbeads. In this study, we applied our screening system to directed evolution of isocitrate dehydrogenase (IDH) consisting of TCA cycle. First, we constructed the IDH enzyme- and DNA-immobilized microbeads by in vitro transcription and translation in emulsion, and confirmed the activity of IDH that immobilized on microbeads by using microfluidic devices having BDD electrodes. Next, we tested the sorting device by PCR amplification of DNA that immobilized on microbeads after selection and collection. We succeeded in sorting droplets including the enzyme- and DNA-immobilized microbeads using the dielectrophoretic sorting device. Finally, we performed screening of a randomly-mutated IDH library constructed by error-prone PCR. The activity of almost mutant enzymes in the initial library was decreased by random mutation in comparison with the wild-type IDH. After dielectrophoretic sorting, the collected DNA in 'High' fraction was amplified by PCR and was used as a template for protein synthesis. The activity of the resulted enzyme library was recovered to the wild-type level, indicating that active enzyme genes in the library were successfully enriched by our μTAS. When we analyzed the sequence and the enzyme activity of randomly-chosen IDH clones, some mutants have higher activity than the wild-type.
Notes	
Genre	Research Paper

URL https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180084

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2018年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2019年3月18日

研究代表者	所属	理工学部	職名	教授	補助額	500 （特B）千円
	氏名	土居 信英	氏名（英語）	Nobuhide Doi		

研究課題（日本語）

人工酵素による高効率多段階反応系の構築と未利用バイオマス有効活用への展開

研究課題（英訳）

Construction of highly efficient multi-step reaction systems using artificial enzymes and their application for effective utilization of unused biomass

１．研究成果実績の概要

酸化還元酵素を用いたバイオ電池は環境負荷が少ないエネルギー生産システムとして注目されているが、出力が低く寿命も短いため実用化には至っていない。そこで、進化工学による酵素の活性および安定性の向上に向けて、当研究室では、μTAS を用いた酸化還元酵素の独自のスクリーニング系の開発が進められてきた。このスクリーニングシステムは3つのマイクロ流体デバイスからなる。まず、「区画化用デバイス」により、NAD(P)依存性酸化還元酵素とその遺伝子を固定した磁性ビーズを１個ずつ含むように区画化した酵素反応液を作成し、各区画内で独立に酵素反応を行う。次に、「検出用デバイス」により、ビーズ上の酵素活性により生じた各区画ごとの NAD(P)H の酸化電流値を導電性ダイヤモンド（BDD）電極により自動連続測定する。最後に、誘電泳動を利用した「選別用デバイス」により、活性が高い酵素を固定しているビーズを含む液滴を選別・回収する。本研究では、このスクリーニング系を用いて、TCA 回路を構成するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（IDH）の進化実験をおこなった。

まず、マイクロビーズディスプレイ法を用いて、IDH 遺伝子を固定したビーズをエマルション内で無細胞転写翻訳し、酵素とその遺伝子を固定したビーズを作製した。その後、区画化デバイスによって作製された液滴内で酵素反応を行い、活性測定デバイスに内蔵されている BDD 電極によって活性を測定できることを確認した。次に、誘電泳動を用いた選別デバイスにより回収したビーズに固定されている IDH 遺伝子を PCR により増幅することで、活性をもつ IDH 遺伝子を含む液滴を回収できることを確認した。最後に、error-prone PCR によって IDH 遺伝子にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、集団としての酵素活性が低下していることを確認した後、実際に誘電泳動を用いて選別実験を行った。その結果、選別した変異体ライブラリーでは集団としての酵素活性が回復したことから、我々の μTAS によって活性を有する変異体酵素遺伝子をライブラリーから選別できることが確認できた。ライブラリー中のクローンの配列と活性を解析した結果、野生型よりも高い活性をもつ変異体も含まれていた。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Although biofuel cells using oxidoreductases have attracted attention as a power generation system with a small environmental burden, they have not been put into practical use yet due to problems of low output and lifetime. As means for increasing the activity and stability of enzymes, we focused on an evolutionary engineering approach through the development of microfluidic devices for high-throughput screening of oxidoreductases. Our μTAS are composed by three microfluidic devices. First, the encapsulating device makes compartments. One microbeads is encapsulated in each droplet, in which the enzyme reaction occurs. Second, the quantity of NADH in each droplet are detected by the NAD(P)H-measuring device that includes boron-doped diamond (BDD) electrodes. Third, we developed the dielectrophoretic sorting device for whole droplets that contained microbeads. In this study, we applied our screening system to directed evolution of isocitrate dehydrogenase (IDH) consisting of TCA cycle.

First, we constructed the IDH enzyme- and DNA-immobilized microbeads by in vitro transcription and translation in emulsion, and confirmed the activity of IDH that immobilized on microbeads by using microfluidic devices having BDD electrodes. Next, we tested the sorting device by PCR amplification of DNA that immobilized on microbeads after selection and collection. We succeeded in sorting droplets including the enzyme- and DNA-immobilized microbeads using the dielectrophoretic sorting device. Finally, we performed screening of a randomly-mutated IDH library constructed by error-prone PCR. The activity of almost mutant enzymes in the initial library was decreased by random mutation in comparison with the wild-type IDH. After dielectrophoretic sorting, the collected DNA in 'High' fraction was amplified by PCR and was used as a template for protein synthesis. The activity of the resulted enzyme library was recovered to the wild-type level, indicating that active enzyme genes in the library were successfully enriched by our μTAS. When we analyzed the sequence and the enzyme activity of randomly-chosen IDH clones, some mutants have higher activity than the wild-type.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）
Goto, H., Kanai, Y., Yotsui, A., Shimokihara, S., Shitara, S., Einaga, Y., Matsumoto, Y., Miki, N., Fujiwara, K., Doi, N.	Improvement of μTAS for directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases.	μTAS 2018	2018年11月
Aye, S.L., Fujiwara, K., Doi, N.	A dual system using compartmentalized partnered replication for selection of arsenic-responsive transcriptional regulator.	J. Biochem., 164, 341-348	2018年11月
Aye, S.L., Fujiwara, K., Ueki, A., Doi, N.	Engineering of DNA polymerase I from Thermus thermophilus using compartmentalized self-replication.	Biochem. Biophys. Res. Commun., 499, 170-176	2018年5月