

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	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>酸化還元酵素はバイオ電池やバイオセンサーなど多くのアプリケーションで使用されているが、実際の応用は、活性や安定性の低さから比較的限定されていた。酵素を改良する手段として、当研究室では、進化工学によりNAD(P)依存性酸化還元酵素をスクリーニングするための<math>\mu</math>TASの開発が進められてきた。我々の<math>\mu</math>TAS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電極により測定する。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。これまでに、3つのマイクロ流体デバイスを組み合わせて、Error-prone PCRによって構築したIDHのランダム変異体ライブラリーのスクリーニングを2ラウンド行った。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<math>\mu</math>TAS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示唆された。</p> <p>今回は、初期および2ラウンド後のライブラリーからそれぞれ無作為に取得した7つの変異体クローンの比活性をNADHの吸光度より測定した結果、初期ライブラリー由来のクローンはすべて酵素活性が低かったのに対して、2ラウンド後のライブラリー由来のクローンの半数以上は活性を保持していた。その中でも比活性が最も高かった変異体K17Rについて大腸菌で大量発現・精製し、Kineticパラメータと熱安定性を測定した結果、野生型IDHと比べて熱安定性が低下することなく、<math>k_{cat}/K_m</math>が2倍以上向上していた。K17R変異体の変異部位は活性部位・NAD結合部位から離れたところに位置しており、ランダム変異によって予期せぬ部位の変異によるわずかな構造の変化が酵素活性に影響を与えることが示唆された。以上の結果から、本スクリーニング系がNAD(P)H依存性酸化還元酵素の定向進化に適用できることが示された。</p> <p>Although oxidoreductases are used for many applications such as biofuel cells and biosensors, the actual application of NAD(P)-dependent oxidoreductases is relatively limited probably due to their low activity and stability. As means for improving the enzymes, we focused on an evolutionary engineering approach through the development of <math>\mu</math>TAS for high-throughput screening of NAD(P)-dependent oxidoreductases. Our <math>\mu</math>TAS are composed by three microfluidic devices. First, both protein and gene for NAD(P)-dependent oxidoreductase are immobilized on microbeads which is compartmentalized in droplets by 'encapsulating device'. Second, the quantity of NAD(P)H produced by the enzyme reaction in each droplet is detected by 'NAD(P)H-measuring device' with boron-doped diamond electrodes. Third, droplets containing microbeads with highly active enzymes are screened by 'dielectrophoretic sorting device'. In the previous study, we combined the three microfluidic devices and performed screening of a randomly-mutated isocitrate dehydrogenase (IDH) library constructed by error-prone PCR. After two rounds of screening, the activity of the resulted enzyme library was recovered to the wild-type level, suggesting that active enzyme genes in the library were successfully enriched by our <math>\mu</math>TAS.</p> <p>In the present study, we randomly picked up seven mutant clones from each of the initial library and the library after 2 rounds of screening, respectively, and measured their specific activity based on the absorbance of NADH. As a result, the activities of all clones from the initial library were relatively low, while more than half of clones from the 2nd library retained the enzymatic activity. Among these 2nd-library clones, a mutant K17R with the highest activity was expressed in <i>E. coli</i> and purified. Then we measured kinetic parameters and thermal stability of the K17R mutant. As a result, <math>k_{cat}/K_m</math> of the mutant enzyme was higher than that of the wild-type IDH by more than 2-fold, while <math>T_m</math> was retained. The mutation site of the K17R mutant was located far from the active site and the NAD binding site, suggesting that a slight structural change due to a single mutation of the unexpected site affected the enzyme activity. These results indicate that our screening system can be applied to directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases.</p>
Notes	
Genre	Research Paper

URL

[https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara\\_id=2019000007-20190070](https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190070)

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.

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						
<p>酸化還元酵素はバイオ電池やバイオセンサーなど多くのアプリケーションで使用されているが、実際の応用は、活性や安定性の低さから比較的限定されていた。酵素を改良する手段として、当研究室では、進化学により NAD(P)依存性酸化還元酵素をスクリーニングするための <math>\mu</math>TAS の開発が進められてきた。我々の <math>\mu</math>TAS 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電極により測定する。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。これまでに、3つのマイクロ流体デバイスを組み合わせて、Error-prone PCR によって構築した IDH のランダム変異体ライブラリーのスクリーニングを2ラウンド行った。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 <math>\mu</math>TAS 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示唆された。</p> <p>今回は、初期および2ラウンド後のライブラリーからそれぞれ無作為に取得した7つの変異体クローンの比活性を NADH の吸光度より測定した結果、初期ライブラリー由来のクローンはすべて酵素活性が低かったのに対して、2ラウンド後のライブラリー由来のクローンの半数以上は活性を保持していた。その中でも比活性が最も高かった変異体 K17R について大腸菌で大量発現・精製し、Kinetic パラメータと熱安定性を測定した結果、野生型 IDH と比べて熱安定性が低下することなく、<math>k_{cat}/K_m</math> が2倍以上向上していた。K17R 変異体の変異部位は活性部位・NAD 結合部位から離れたところに位置しており、ランダム変異によって予期せぬ部位の変異によるわずかな構造の変化が酵素活性に影響を与えることが示唆された。以上の結果から、本スクリーニング系が NAD(P)H 依存性酸化還元酵素の定向進化に適用できることが示された。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Although oxidoreductases are used for many applications such as biofuel cells and biosensors, the actual application of NAD(P)-dependent oxidoreductases is relatively limited probably due to their low activity and stability. As means for improving the enzymes, we focused on an evolutionary engineering approach through the development of <math>\mu</math>TAS for high-throughput screening of NAD(P)-dependent oxidoreductases. Our <math>\mu</math>TAS are composed by three microfluidic devices. First, both protein and gene for NAD(P)-dependent oxidoreductase are immobilized on microbeads which is compartmentalized in droplets by 'encapsulating device'. Second, the quantity of NAD(P)H produced by the enzyme reaction in each droplet is detected by 'NAD(P)H-measuring device' with boron-doped diamond electrodes. Third, droplets containing microbeads with highly active enzymes are screened by 'dielectrophoretic sorting device'. In the previous study, we combined the three microfluidic devices and performed screening of a randomly-mutated isocitrate dehydrogenase (IDH) library constructed by error-prone PCR. After two rounds of screening, the activity of the resulted enzyme library was recovered to the wild-type level, suggesting that active enzyme genes in the library were successfully enriched by our <math>\mu</math>TAS.</p> <p>In the present study, we randomly picked up seven mutant clones from each of the initial library and the library after 2 rounds of screening, respectively, and measured their specific activity based on the absorbance of NADH. As a result, the activities of all clones from the initial library were relatively low, while more than half of clones from the 2nd library retained the enzymatic activity. Among these 2nd-library clones, a mutant K17R with the highest activity was expressed in <i>E. coli</i> and purified. Then we measured kinetic parameters and thermal stability of the K17R mutant. As a result, <math>k_{cat}/K_m</math> of the mutant enzyme was higher than that of the wild-type IDH by more than 2-fold, while <math>T_m</math> was retained. The mutation site of the K17R mutant was located far from the active site and the NAD binding site, suggesting that a slight structural change due to a single mutation of the unexpected site affected the enzyme activity. These results indicate that our screening system can be applied to directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases.</p>						
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., Oyobiki, R., Fujiwara, K., Watanabe, T., Einaga, Y., Matsumoto, Y., Miki, N., Doi, N.	Microfluidic screening system based on boron-doped diamond electrodes and dielectrophoretic sorting for directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases.	Lab on a Chip	2020年2月21日			
後藤遥菜, 金井佑貴, 藤原慶, 栄長泰明, 三木則尚, 土居信英	マイクロ流体デバイスを用いたイソクエン酸デヒドロゲナーゼの定向進化	第42回日本分子生物学会年会	2019年12月3日			