

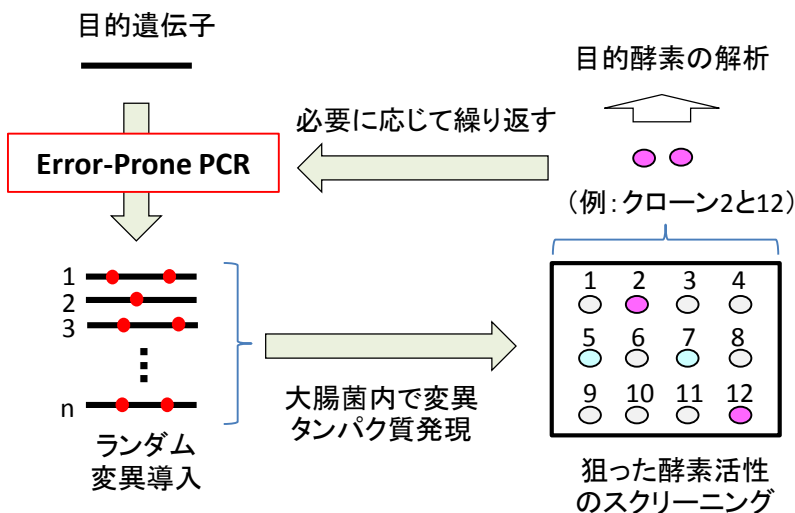
はじめに：近年、自然界には存在しない酵素を人工的に作り出す手法の一つとして“指向性進化法(directed evolution)”が大きく注目されています。米国のFrances H. Arnold教授は、この手法のパイオニアとして2018年にノーベル化学賞を受賞しました。

今回の「クロンテック通信」は、指向性進化法の重要なステップであるランダム変異導入に利用可能な『Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit』の紹介と本キットを使った最近の論文情報をお届けします。

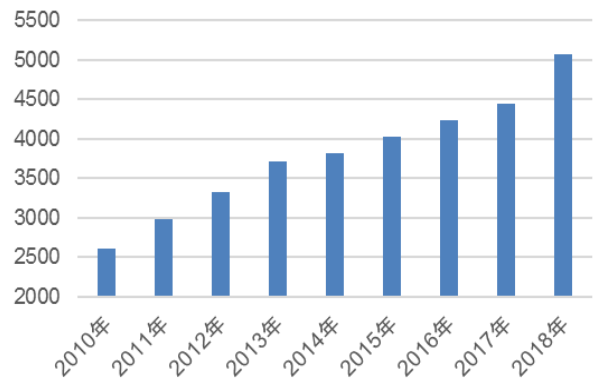
## 指向性進化法について

指向性進化法(directed evolution)とは、生物が本来持っているタンパク質や核酸の機能を人工的に改変する実験手法です。図1に示すように、目的遺伝子にランダム変異を導入(Error-Prone PCR)することによって、狙った活性を有する酵素を効率的にスクリーニングすることが可能です。この手法を導入することで、例えば、医薬品の製造工程のスピードアップ(酵素の反応時間の短縮)や副産物の低減などが期待されます。指向性進化法に関連する論文は年々増加しています(図2)。

### ◆ 指向性進化法の流れ(図1)



### ◆ 指向性進化法に関する文献数の推移(図2)※



※ 文献数は Google Scholar により集計した。

## Error-Prone PCR

Error-Prone PCR法とは、特定の遺伝子に対してPCR時の複製エラーを利用してランダム変異を導入する手法です。PCR時の複製エラーは、PCRバッファーにマンガン(Mn<sup>2+</sup>)を加えたり、dNTPの各ヌクレオチドの量比を変えたりすることで著しく誘発されます。

Error-Prone PCRによるランダム変異導入は、効率的かつ簡便な手法であるため、指向性進化法で頻繁に用いられています。2018年度のノーベル賞受賞者であるFrances H. Arnold教授らのグループも関連する研究でこの手法を用いています。

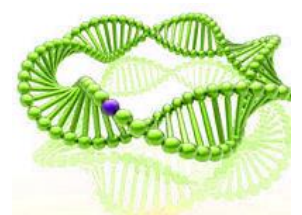
Hammer S.C. *et al.*, (2017) Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis. **Science** 358, 215–218.

## タカラバイオがおススメするError-Prone PCRによるランダム変異導入用キット

### Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit

(製品コード 630703)

- 特長:**
1. 突然変異発生率を正確にコントロール
  2. ホットスポットを生じず、広範囲に変異が分布
  3. 全種類の塩基配列置換が可能



裏面：タカラバイオのキット及び使用文献の紹介

## Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit

(製品コード 630703)

本キットは、Error-Prone PCRを用いたランダム変異導入キットです。バッファーへのMn<sup>2+</sup>とdGTPの添加量を変えることで、変異導入率を1,000 bp当り2~8まで調節することができます(図3)。また、Titanium Taq PCRシステムは、4 kbまでのDNA断片を増幅可能なため(図4)、短いDNA断片だけでなく、オペロン、プラスミド、タンパク質をコードする配列への変異誘発にも使用することができます。図5に、バッファー条件の違いによる各クローン中の変異分布を示します。

### ◆ バッファー条件による変異率の調節

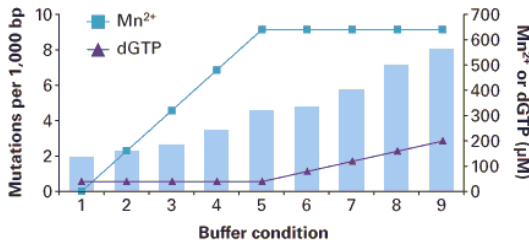


図3. バッファー条件1, 5, 9の変異率は、15,000 bp以上の広範囲にわたるDNAシーケンシングから求めた。他の変異率は、*in vivo*突然変異誘発アッセイの結果をシーケンシングデータとして標準化した。

### ◆ 4 kb断片の増幅

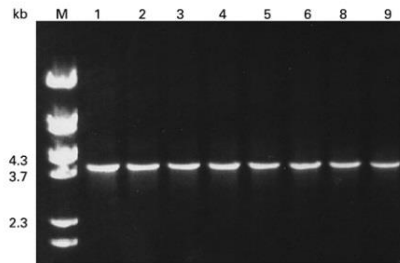


図4. 左図に示したバッファー条件で、4 kbプラスミドの増幅を行った。レーン1~9はPCRバッファー条件1~9に対応する。レーンM: DNAサイズマーカー

### ◆ バッファー条件と各クローン中の変異分布

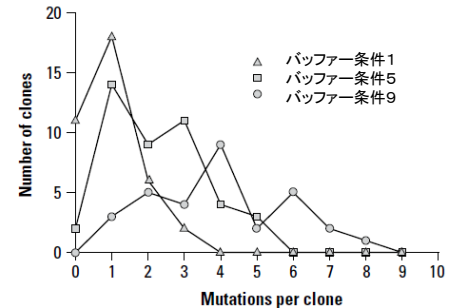


図5. バッファー条件1, 5, 9の各クローン中の変異分布。変異率は変異導入を行った490bp DNA断片のシーケンシング解析から求めた。

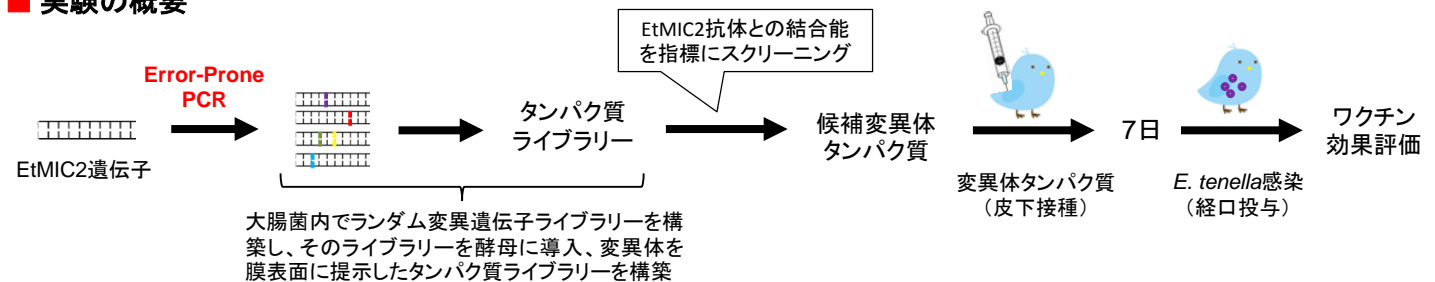
## 本キット使用文献の紹介

### ◆ 原虫に対するワクチン効果の改善

Chen Z., et al. (2018) Improving the immunogenicity and protective efficacy of the EtMIC2 protein against *Eimeria tenella* infection through random mutagenesis. *Vaccine*. 36(18):2435-2441.

病原性原虫である*Eimeria tenella*(鶏コクシジウム)由来のEtMIC2遺伝子に対してDiversify™ PCR Random Mutagenesis Kitを用いて変異体ライブラリーを作製し、抗原性に優れたEtMIC2変異体タンパク質を選別、野生型タンパク質よりも優れたワクチン効果をもつ変異体を同定した。

#### ■ 実験の概要



### ◆ カプロラクタムに高感度に応答する転写因子(NitR)のスクリーニング

Yeom S.J., et al. (2018) A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts. *Nat Commun*. 29;9(1):5053.

転写因子であるNitRは、ε-カプロラクタム(CL)存在下でnitA遺伝子の発現を活性化する。このnitR遺伝子のランダム変異ライブラリーをDiversify™ PCR Random Mutagenesis Kitにより作製し、微量なCLでも高感度にnitAのプロモーターを活性化する変異体(NitR-L117F)を同定した。これにより、CLの生合成経路に関わる酵素の高感度検出システムを開発した。

#### ■ 実験の概要

