

## 固液界面で機能する核酸-酵素コンジュゲートの設計とその高度利用

高原, 茉莉

<https://hdl.handle.net/2324/1807002>

---

出版情報 : 九州大学, 2016, 博士 (工学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏 名 : 高原 茉莉

論 文 名 : 固液界面で機能する核酸-酵素コンジュゲートの設計とその高度利用

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

特定の分子に対して特異的な相互作用を示す機能性一本鎖核酸は、核酸アプタマーと呼ばれている。核酸アプタマーが示す分子認識特性や、核酸が本来有する配列特異的な結合特性を、酵素の触媒特性と融合することで、新たな性質を有する人工コンジュゲート分子を創出することができる。特に、核酸部位として DNA を用いた DNA アプタマー-酵素コンジュゲートは、標的分子に対して酵素の触媒作用を近接・配向することができることから、医療や分析分野において、その応用が広く検討されている。

異種生体分子からなるコンジュゲートの調製においては、各分子ユニットの機能損失を伴わない部位特異的な修飾と効率的な結合形成が重要である。そこで本研究では、酵素反応の基質特異性を利用した部位特異的な修飾法により、各分子ユニット間が選択的且つ共有結合的に連結された DNA アプタマー-酵素コンジュゲートを設計し、高度利用することを目標とする。具体的な研究戦略として、二つの酵素、ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) 及び微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) の触媒機能を利用し、MTG の基質ペプチドが修飾された DNA アプタマーの調製、酵素タンパク質との部位特異的なコンジュゲーション条件の最適化を通して、基本技術を確立する。確立された基本技術に基づき、異なる機能を有する DNA アプタマーと酵素からなるコンジュゲート分子を調製し、高感度タンパク質検出試薬及び人工バイオマス分解酵素を創製することを目標とする。

本論文の構成は以下の通りである。

第二章では、DNA アプタマー-酵素コンジュゲートの設計に際し、トロンビン結合性アプタマーと大腸菌由来アルカリホスファターゼ (BAP) をユニット分子のモデルとして選択した。まず、BAP の N 末端に MTG が認識可能な Lys を含むアミノ酸配列を遺伝子工学的手法により導入した BAP (NK14-BAP) を調製した。次に、2種類の MTG 基質 (Z-QG) 修飾ヌクレオチドを使い分け、これらを TdT 反応によりトロンビン結合性アプタマーの末端選択的に導入することで、Z-QG 標識数の異なる DNA アプタマーを調製した。得られた各種アプタマーと NK14-BAP を、MTG 反応を介して部位特異的に架橋することで、単位アプタマーユニット当たりの酵素標識数が異なるアプタマー-BAP 複合体を得ることに成功した。調製したアプタマー-BAP 複合体により、サンドイッチ型固相免疫測定法の二次抗体を置換することで、トロンビンを標的分子とするアッセイを行い、各コンジュゲート分子のそれぞれの分子ユニットの機能が維持されていることを確認した。

第三章では、DNA アプタマー-酵素コンジュゲート分子調製時の TdT 反応におけるヌクレオチド基質を変更し、複数の酵素分子がマルチラベル化されたコンジュゲートを調製した。まず、TdT 反

応における、Z-QG 修飾ヌクレオチドと天然型ヌクレオチド (dNTP) を混合することで、MTG 基質修飾ヌクレオチドの導入効率を向上することができた。各ヌクレオチド導入効率の定量的な解析から、dNTP と Z-QG 修飾ヌクレオチドの最適混合比を決定した。次に、MTG 反応により、Z-QG が複数箇所修飾されたトロンビン結合性アプタマーを NK14-BAP と架橋し、生成物のアプタマー当たりの酵素標識数をサイズ排除クロマトグラフィーにより見積もった。第二章と同様の手法によりコンジュゲートの機能性評価を行い、アプタマーの機能性と酵素標識数の相関を検証することで、高感度検出に向けた分子設計についての指標を得た。

第四章では、セルロース結合性アプタマーとセルラーゼの触媒ドメインの複合化を行い、アプタマーの特性（塩濃度応答性）が反映された新規人工バイオマス分解触媒の開発を行った。まず、セルラーゼの触媒ドメインの至適温度にあわせたアプタマーの設計を行うため、DNA 高次構造予測プログラムと、アプタマーの結合モチーフ解析、結合モチーフの温度安定性を円二色性スペクトルにより評価し、既往のセルロース結合性アプタマーを本研究に適した仕様へと改変した。再設計されたアプタマーの機能性は、セルラーゼの基質であるセルロースに対する吸着挙動から評価した。次に、第二章で確立した手法に基づき、DNA とタンパク質を定量的 (1:1) にコンジュゲーションすることで、セルロース結合性アプタマーがセルラーゼの触媒ドメインに部位特異的に連結された新規コンジュゲートを調製した。セルロースの加水分解反応によりコンジュゲートの機能性を評価したところ、初期活性は及ばないものの、最終到達点での反応率は天然酵素に匹敵する人工セルラーゼを得ることに成功した。

第五章として、本論文の総括を行い、本研究の今後について述べた。