



# Tailing DNA aptamers with a functional protein by two-step enzymatic reaction

二種類の酵素反応を介した末端特異的なDNA アプタマーへの機能性タンパク質標識

(JBB, Vol. 116, No. 6, 660–665, 2013)

高原 茉莉<sup>1</sup>・林 浩之輔<sup>1,2</sup>・後藤 雅宏<sup>1,3</sup>・神谷 典穂<sup>1,3\*</sup>

核酸アプタマーとは、標的分子に対して特異的な親和性で結合する一本鎖核酸で、抗体に匹敵する機能を有する生体分子認識素子である。そのため、抗体と同様に分析試薬、医薬品への応用において、核酸アプタマーへの機能性分子の標識が幅広く検討されている。分析分野、たとえば標的分子の検出においては、シグナル増幅分子として酵素を非共有結合的にDNAアプタマーに標識したバイオコンジュゲートが報告されている<sup>1)</sup>。医薬品としては、DNAアプタマーが標的分子と結合することで阻害剤となるMacugen<sup>®</sup>が市販され、さらに標的指向部位として、RNAアプタマーをキャリアに修飾することで標的的特異的な薬物送達が達成されている<sup>2)</sup>。

DNAアプタマーと機能性分子の複合化においては、アプタマーそのものの結合対象分子との親和性、アプタマーに標識される生体分子の機能性の維持が必須であることから、部位特異的な複合化が好ましい。筆者らは先行研究として、化学修飾したオリゴ核酸と酵素のコンジュゲートの調製を試みたが、複合化効率には必ずしも高いものではなかった<sup>3)</sup>。そこで筆者らは、二つの酵素触媒の基質特異性および高反応効率に基づいた新たな部位特異的な複合化法の開発を試みた。

一つ目の酵素は一本鎖DNAおよびRNAの3'-OH末端に反応点となる化学修飾ヌクレオチドを導入可能なターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (TdT)、二つ目の酵素は導入した末端反応点においてDNAと酵素を複合化する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) である。前者のTdTは核酸の3'-OH末端にプライマー非依存的にヌクレオチドを付加するため、一本鎖DNAアプタマーに直接化学修飾を施すのに適している。後者のMTGは、特定のグルタミン残基 (Gln) とリジン残基 (Lys) の側鎖間アシル転移反応を触媒する。そこでまず、TdT触媒反応によりトロンピン結合性DNAアプタマーの3'末端にMTGの基質ペプチド (Z-Gln-Gly) が修飾された合成ヌクレオチド (Z-QG-ddUTPもしくはZ-QG-dUTP<sup>4)</sup>) を導入した。一方、大腸菌由来アルカリホスファターゼ (BAP) に、

遺伝子工学的手法でMTGが認識可能なLysを含む基質ペプチド配列を融合した組換え酵素 (K-BAP) を調製し、これらをMTG触媒反応により基質ペプチド間で部位特異的に架橋することを試みた。K-BAPの標識数はTdT反応における基質選択により制御し、導入したZ-QGの数に応じてMTG反応によりK-BAPが架橋されるため、酵素が一分子だけ標識されたBAP-アプタマー、複数分子標識された(BAP)<sub>n</sub>-アプタマーを容易に作り分け可能である。

二つの触媒反応では、DNAアプタマーに対してZ-QGおよびBAPが各段階でほぼ定量的に導入され、高効率かつ部位特異的な複合化を達成した。得られた二種のDNAアプタマー-BAPコンジュゲートの機能を、サンドイッチ型固相免疫測定法における二次抗体をコンジュゲートで置換したenzyme-linked aptamer assay (ELAA) で評価したところ、標的分子トロンピンの濃度に応じてシグナルが増加する典型的なシグモイダル応答が得られ、酵素およびDNAアプタマー部位の機能保持が確認された。また、DNAアプタマー一本鎖あたりのBAP標識数が異なるBAP-アプタマーおよび(BAP)<sub>n</sub>-アプタマーのトロンピン検出感度を比較すると、(BAP)<sub>n</sub>-アプタマーは最大で4倍のシグナルを示し、検出限界は3分の1 (0.12 nM) まで低下し、酵素標識数の増加に伴う高感度化が可能なが示唆された。本論文で提案する二種類の酵素反応を組み合わせた手法は、短いペプチド配列をDNA、タンパク質双方に導入するだけで触媒反応による複合化が可能であるため、一本鎖DNA-タンパク質コンジュゲートの利用に幅広く応用可能であることが期待される。

- 1) Centi, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **79**, 1466 (2007).
- 2) Farokhzad, O. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6315 (2006).
- 3) Tominaga, J. *et al.*: *Chem. Commun.*, 401 (2007).
- 4) Kitaoka, M. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **17**, 5387 (2011).

\*著者紹介 <sup>1</sup>九州大学大学院工学研究院応用化学部門 E-mail: nori\_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

<sup>2</sup>日立アロカメディカル (株), <sup>3</sup>九州大学未来化学創造センターバイオテクノロジー部門