

熱安定性が高いヘム-DNA 酵素のペルオキシダーゼ活性の解析

(筑波大院教物) ○深澤 大輝・百武 篤也・山本 泰彦

Characterization of Peroxidase Activities of Thermostable Heme-DNAzymes

(Department of Chemistry, University of Tsukuba)○Daiki Fukasawa, Atsuya Momotake, Yasuhiko Yamamoto

Heme binds specifically to G-quadruplex DNA to form a heme-DNAzyme that exhibits peroxidase activity. In this study, we characterized the peroxidase activities of heme-DNAzymes formed from parallel G-quadruplex DNAs possessing three, four, or five G-quartets stacked on top of each other in the hydrophobic core of the DNA which contributes to stability of the G-quadruplex structure. We found that highly thermostable heme-DNAzymes can be prepared through stabilizing the DNA structure.

Keywords : G-Quadruplex DNA, Heme, Heme-DNA Complex, Peroxidase Activity, Thermal Stability.

DNA 塩基配列 d(TTAGGGA) は、カリウムイオンなどのカチオン存在下で、G-カルテット (Fig. 1A) と呼ばれる特徴的な構造の形成を通して、四重鎖 DNA ([d(TTAGGGA)]₄) として存在する。ヘム (鉄(III)プロトポルフィリン IX 錯体 (Fig. 1B)) は、[d(TTAGGGA)]₄ の 3' 末端 G-カルテットに特異的に結合し、ペルオキシダーゼ活性を示す“ヘム-DNA 酵素”を形成する (P. Travascio *et al.* (1988), Y. Yamamoto *et al.* (2015))。

本研究では、[d(TTAGGGA)]₄ の疎水性コアで積層する G-カルテットを 3 枚から、4 枚、5 枚に増やした [d(TTAGGGGA)]₄、[d(TTAGGGGGA)]₄ を用いて調製したヘム-DNA 酵素のペルオキシダーゼ活性の温度依存性を解析し、四重鎖 DNA の熱安定性がヘム-DNA 酵素の機能に与える影響を明らかにした。

はじめに、円二色性 (CD) スペクトルによりこれらの四重鎖 DNA の熱安定性を計測した。その結果、四重鎖 DNA の濃度 5 μM、[K⁺] = 125 mM で、[d(TTAGGGA)]₄ の変性温度 (*T*_m) は約 62 °C、[d(TTAGGGGA)]₄ および [d(TTAGGGGGA)]₄ の *T*_m は 100 °C を越えることが明らかとなり、疎水性コアで積層する G-カルテットの枚数を増やすことにより、四重鎖 DNA の熱安定性は大幅に増大することが確認できた。

次に、これら四重鎖 DNA とヘムで調製した 3 種類のヘム-DNA 酵素のペルオキシダーゼ活性を、基質 Amplex Red の酸化により生じる Resorufin の濃度上昇の初速度を指標にして評価した。その結果、ヘム-DNA 酵素のペルオキシダーゼ活性自体は四重鎖 DNA の熱安定性には依存しないことが明らかになった。また、いずれのヘム-DNA 酵素でも、構成要素である四重鎖 DNA の *T*_m 近くまで活性は保たれることが明らかになった。したがって、DNA の安定性を高くすれば、100 °C 以上でも変性しないヘム-DNA 酵素が調製できることが実証された。

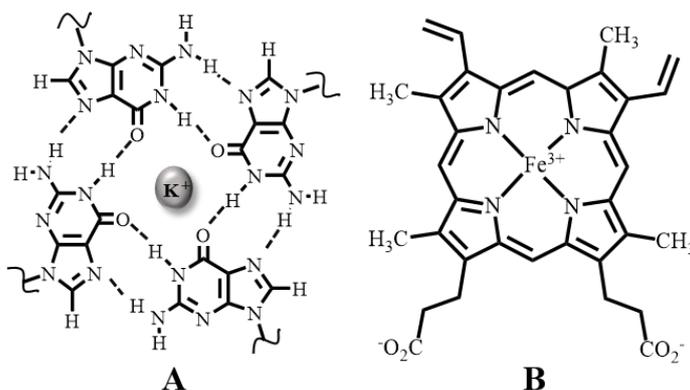


Fig.1. Molecular structures of G-quartet (A) and heme (Fe(III)-protoporphyrin IX complex) (B).