

カスケード反応効率化のための DNA を介した酵素複合体の作製

(群馬理工¹・群大院理工²) ○豆生田 葵衣¹・神谷 厚輝²

Construction of DNA-mediated enzyme complex for high catalytic enzyme efficiency (¹*School of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Aoi Mameuda,¹ Koki Kamiya²

A proximity of enzymes into a cytoplasm causes efficient enzyme cascade reactions. Therefore, catalytic enzyme efficiencies will be improved by a local increase in concentration of enzyme in vitro. To realize this condition, each enzyme is bound via linker or DNA, assembled on DNA origami tile¹⁾, or encapsulated in nanoparticles²⁾. In this study, we attempt to assemble three enzymes using 3-way junction DNA. We prepared single-stranded DNAs (ssDNAs) which form the triply-branched structure by a hybridization reaction (Fig.1). The ssDNA with amino group at terminal was conjugated to NHS ester-PEG₄-maleimide. To obtain ssDNA-PEG₄-enzyme, three types of thiolated enzymes (horseradish peroxidase, glucose oxidase and β -galactosidase) were reacted with three different ssDNA-PEG₄-maleimide, correspondingly. The purified ssDNA-PEG₄-enzymes were analyzed by a native PAGE.

Keywords : Enzyme; ssDNA; DNA hybridization; Bioconjugation

細胞質内では酵素同士が近接することで、効率的な酵素カスケード反応が生じる。したがって、試験管内においても酵素の局所的な濃度増加を再現することで、触媒効率向上が見込める。タンパクの接近を目的として、リンカーを介した結合や DNA オリガミ上への固定¹⁾、ナノカプセルへの封入²⁾などが多く行われている。そこで、我々はリポソームへ酵素複合体を封入した効率的なバイオリアクタ創成を最終目的とし、三又構造を有する DNA を用いて 3 種の酵素の近接を試みた(Fig.1)。末端にアミノ基を有する 1 本鎖 DNA は NHS エステル-PEG₄-マレイミドと結合させ、ssDNA-PEG₄-マレイミドを作製した。そして、システイン修飾した 3 つの酵素(HRP, GOx, β -Gal)に、相補的な配列を持つ 3 種の ssDNA-PEG₄-マレイミドを結合した。ssDNA-PEG₄-酵素は陰イオン交換クロマトグラフィーで精製後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、フリー酵素のバンドと比較することにより生成を確認した。

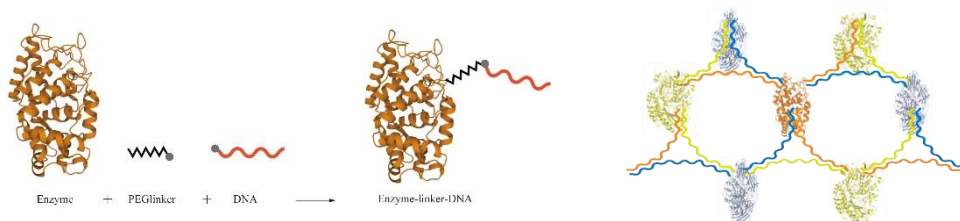


Fig.1 DNA 修飾酵素の作製と複合体形成の概略

- 1) Jinglin Fu, Minghui Liu, Yan Liu, Neal W. Woodbury, and Hao Yan, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 5516-5519
- 2) Shuai Jiang, Lucas Caire da Silva, Tsvetomir Ivanov, Milagro Mottola, and Katharina Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 10.1002/anie.202113784