

## DNA を介して近接・分離する酵素ネットワークによる miRNA 検出

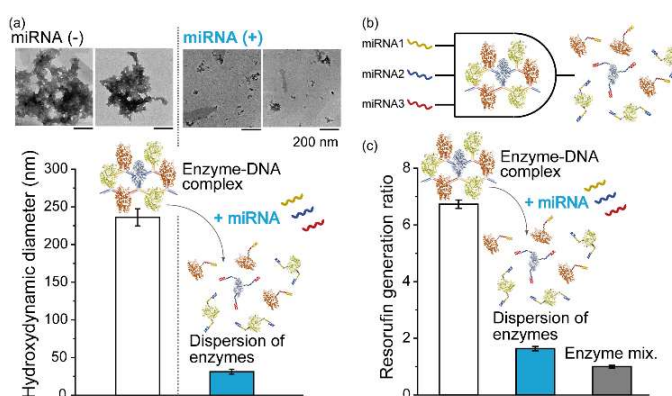
○ 豆生田 葵衣<sup>1</sup>・瀧ノ上 正浩<sup>2</sup>・神谷 厚輝<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>群馬大院理工、<sup>2</sup>東工大情報理工学院 )

**Construction of miRNA detection system by proximity and dispersion of enzymes via DNA motifs** (Graduate School of Science and Technology, Gunma University<sup>1</sup>, Department of Computer Science, School of Computing, Tokyo Institute of Technology<sup>2</sup>) MAMEUDA, Aoi<sup>1</sup>; TAKINOUE, Masahiro<sup>2</sup>; KAMIYA, Koki<sup>1</sup>

細胞質では生体分子が高密度に存在し、代謝経路やシグナル伝達などの酵素カスケード反応は効率的に進む。試験管内で細胞内の高効率な反応を再現するため、酵素同士の近接による局所濃度増加が様々なアプローチで行われてきた。例えば、ポリマー鎖上での二種の酵素の近接<sup>1</sup>が報告されているが、ポリマーと酵素は強固な化学結合で繋がれており、酵素の近接と分離を自由に制御することは困難であった。そこで、配列特異的な二本鎖形成と一本鎖への分離を可逆的に生じる DNA 鎖を利用することで、酵素の配置順序の制御や外部刺激に応答した近接・分離の制御を試みた。

本研究では、三又構造を有する DNA を介して三種の酵素を近接した酵素-DNA 複合体ネットワークを作製し、生体分子の入力に応じて近接と分離の切り替えを行うことで、酵素カスケード反応の制御を可能にした。さらに、酵素-DNA 複合体ネットワークを応用し、乳がんのバイオマーカーである三種の micro RNA (miRNA) を検出することに成功した。まず、三又構造を形成する三種の一本鎖 DNA (ssDNA)-PEG<sub>4</sub>-マレイミド、リジン残基部にチオール基を導入した β-ガラクトシダーゼ (βGal)、グルコースオキシダーゼ (GOx)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を準備し、マレイミド基とチオール基の反応により三種の酵素-ssDNA を作製した。これらの酵素-ssDNA を混合し、SDS-PAGE によりみかけの分子量の増大、動的光散乱法により流体力学的直径の増大を確認した。三種の酵素-ssDNA 混合物は 74.4 ± 4.2 nm の流体力学的直径を示し、未修飾酵素の直径の 4.4 倍であった。βGal, GOx, HRP が順に触媒する酵素カスケード反応を行うと、ネットワーク形成時には分散した未修飾酵素の約 7 倍量の最終生成物を得た。続いて、酵素-ssDNA に RNA 鎖や RNase を添加することで、酵素の近接と分離が制御可能であることを流体力学的直径とカスケード反応の最終生成物濃度から明らかにした。

さらに、三又構造を有する DNA に miRNA と相補的な配列を組み合わせ、三種 miRNA 存在下で酵素が分離する設計 (Fig 1(b)) を施して miRNA の検出を行った。miRNA 相補配列を組み込んだ酵素-DNA 複合体の流体力学的直径は miRNA 非存在下で増大し、全三種の miRNA 存在下で減少、カスケード反応の抑制がみられた (Fig. 1(a) 下, (c))。透過型電子顕微鏡を用いた観察からも、miRNA 存在下でネットワークの分離が生じることが示された (Fig 1(a) 上)。本研究で構築した酵素-DNA 複合体の可逆的な近接・分離制御システムは、miRNA 検出によるがん検査、生体分子の入力に応答して小分子を産生する人工細胞や分子ロボットの作製への貢献が期待される。



**Fig 1.** Detection of three miRNAs using enzyme-DNA complex network. (a) TEM observations and DLS measurements of enzyme-DNA complexes with/without three miRNAs. (b) Combination of DNA computing and three enzyme-DNA complex for three miRNA detections as AND operation. (c) Final product generation ratio in the three enzyme cascade reaction with/without three miRNAs.

1. Grotzky, A., Nausser, T., Erdogan, H., Schlüter, A. D. & Walde, P. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11392–11395 (2012).