

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06522

研究課題名(和文)核酸アプタマーをリムーバブルマスク剤とする酵素の領域選択的高分子修飾法の開発

研究課題名(英文) The use of nucleic acid aptamers as a removable masking agent for the controlled polymer modification of enzymes

研究代表者

笹井 泰志 (Sasai, Yasushi)

岐阜医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60336633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプシンの活性阻害剤として作用するDNAアプタマー(Tryp-Apt)に対して相補的塩基対を形成するオリゴDNA(pmDNA)が、任意のタイミングでトリプシン-Tryp-Apt複合体からTryp-Aptを解離させることができるリムーバーとして機能することを明らかにした。そこでTryp-Apt存在下でウシトリプシンの高分子修飾を実施したところ、pmDNA処理後Tryp-Apt非存在下で修飾した場合と比較して、高い活性を持つ高分子修飾トリプシンの調製が可能であった。以上の結果は、Tryp-Aptはトリプシンの化学修飾の際の酵素活性部位を保護する効果的な保護剤として利用できるが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素をはじめとするタンパク質が医薬品開発をはじめ様々な分野で応用されている。一方、タンパク質はしばしば安定性に問題を持っており、その改善法の一つに水溶性高分子による修飾がある。一方、タンパク質の化学修飾では、活性の低下がしばしば認められる。本研究の成果は、アプタマーが酵素の活性部位の保護剤として有効であること、そして、アプタマー存在下で酵素の高分子修飾を行うことで酵素活性部位が保護され、高分子修飾による酵素の活性低下を軽減できること、を明らかにしている。これらは、アプタマーを利用した新しいタンパク質修飾法に関する有益な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the DNA aptamer of bovine trypsin (Tryp-Apt) can be dissociated from the complex of bovine trypsin and Tryp-Apt at any time by using oligo-DNA (pmDNA) that forms complementary base pairs to Tryp-Apt. The enzymatic activity of Tryp after removal of Tryp-Apt from the complex was approximately 90% of the initial activity, indicating that on-off control of trypsin activity can be achieved by combining Tryp-Apt and pmDNA. In addition, the docking simulation results suggested that Tryp-Apt covers around the active site of bovine trypsin. These results suggest that Tryp-Apt can be used as a reversible masking agent to protect the active site of bovine trypsin. We therefore examined polymer modification of bovine trypsin in the presence of Tryp-Apt. The enzyme activity was higher than that of the modification in the absence of Tryp-Apt, indicating that Tryp-Apt acts as an effective protecting agent of the active site during chemical modification of bovine trypsin.

研究分野：物理系薬学、高分子化学

キーワード：アプタマー トリプシン 高分子-酵素複合体

### 1. 研究開始当初の背景

酵素は、生命活動に関わる重要物質として、医薬品目的での利用に加え、各種 *in vitro* 評価系や有機化合物の構造変換など、様々な場面で利用されている。一方、多くの酵素は、至適条件が生体環境であり、使用条件が限定される。また、安定性も乏しく、経時的な活性の低下や生体内では酵素的な分解や免疫原性の発現も克服すべき課題である。そのような酵素の性質を改良する方法の一つに酵素の高分子による修飾が有効であることはよく知られている。一方、酵素の高分子修飾では、安定性の改善と引き換えに、その触媒活性の低下が避けられない。その主な理由には、修飾高分子により活性部位への基質分子のアクセシビリティが低下すること、そして、化学的修飾により活性に関わる部分に構造変換が生じること、が考えられる。したがって、これら酵素の高分子修飾に伴う酵素活性の低下を回避できる技術開発により、より高活性で効率的に機能を発現する高分子修飾酵素が合成可能と期待される。

### 2. 研究の目的

核酸アプタマーは、標的物質に対し高い親和性と特異性を持つ一本鎖の DNA あるいは RNA であり、生物学的手法でしか得られない抗体と比べ、安定性や生産面でのメリットは大きく、抗体に代わる分子認識物質として注目され、医薬品への応用も広く展開されている。我々は、近年の核酸アプタマー活用に関する知見に基づき、核酸アプタマーを酵素活性部の一時的なマスク剤として利用する酵素の高分子修飾法の確立を目標としている(図1)。当該酵素修飾法は、酵素活性部位に結合するアプタマーで活性部位を保護(マスク)する、アプタマー存在下での酵素を高分子修飾する、アプタマーに対し相補的な塩基配列を持つオリゴ DNA をリムーバーとして用い、アプタマーを酵素から解離させ、酵素活性を復活させる、の3ステップで実施するものである。本酵素修飾法の実現可能性と有用性を検証すべく、本研究では、まず、ウシトリプシンについて、その酵素阻害活性を有するアプタマー(Tryp-Apt)を用い、Tryp-Apt に対して相補的塩基対を形成するオリゴ DNA (pmDNA) が、トリプシン - Tryp-Apt 複合体から、Tryp-Apt を効果的に解離させることができるか、すなわち、pmDNA のリムーバーとしての有用性について検討した。また、Tryp-Apt 存在下でトリプシンの高分子修飾を実施し、図1に示した高分子修飾法が酵素活性に及ぼす影響についても検討した。

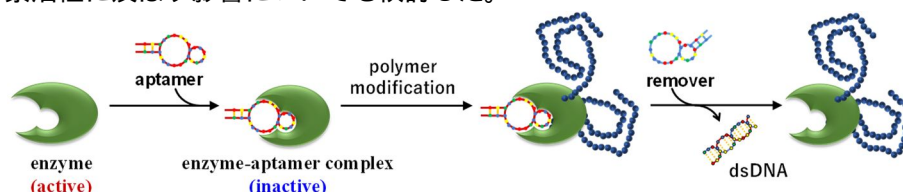


図1 核酸アプタマーを利用した酵素の高分子修飾法

### 3. 研究の方法

トリプシン(ウシ膵臓由来、生化学用)は、富士フィルム和光純薬より購入したものをを使用した。Tryp-Apt には、Malicki らがウシトリプシンの酵素活性を阻害することを報告している 90 塩基からなる一本鎖 DNA 配列 (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **34** (2019) 638) と同様のオリゴ DNA を購入し、本オリゴ DNA が本研究で使用したウシトリプシンの酵素活性を阻害することを確認して使用した。pmDNA は、Tryp-Apt と補的塩基対を形成する配列のオリゴ DNA を購入し、使用した。

トリプシンの合成ペプチド基質である benzoyl-L-arginine p-nitroanilide hydrochloride (L-BAPNA) のトリプシンによる分解速度をトリプシンの活性とした。

トリプシンと Tryp-Apt のドッキングシミュレーションは、Tryp-Apt の塩基配列から RNAfold (<http://www.idtdna.com/UNAFold>) を用いた 2 次構造予測 DNA を RNA に変換したものについて RNAComposer (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>) で立体構造予測 RNA を DNA に戻したものについて統合計算化学ソフトウェア MOE (Chemical Computing Group Inc.) を用いた構造最適化 HDock SERVER (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) を用いて、ウシトリプシン(タンパク質データベースに登録されているウシ膵臓由来トリプシン(1S0Q)の結晶構造を使用)とのドッキングシミュレーション実施、の手順で実施した。

トリプシン修飾用の高分子には、末端に N-hydroxysuccinimide 活性エステルを導入した poly(N-isopropylacrylamine)(pNipaam)を合成し、使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) Tryp-Apt のウシ膵臓由来トリプシン阻害活性評価

図2は、種々濃度の Tryp-Apt を 0.125 μM のトリプシンとともに室温で 20 分間インキュベート後、反応系におけるトリプシン残存活性を Tryp-Apt の濃度に対しプロットした結果である。トリプシン残存活性は、反応系の T24 濃度に対し、指数関数的に低下し、トリプシンに対し、6

等量以上の T24 存在下では、ほぼ定常化した。この Tryp-Apt によるトリプシンの酵素阻害活性作用は S. Malichi らが報告している結果とほぼ同値であり、本研究で使用したウシ膵臓由来トリプシンに対しても、高い酵素阻害活性を示すことを確認した。図 3 は、トリプシンと Tryp-Apt のドッキングシミュレーションにより推定したトリプシンと Tryp-Apt の複合体の立体構造を示している。Tryp-Apt はトリプシン活性部位近辺を覆う形で相互作用しており、基質の接近を阻害していることが示唆された。そして、この推定構造は図 2 の結果を支持するものである。ただし、今回の解析結果は、DNA アプタマーである Tryp-Apt を RNA に変換したものについて立体構造が最適化されたものであり、あくまで参考データと考えている。

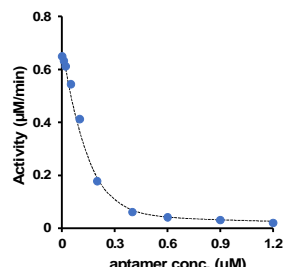


図 2 トリプシン酵素活性阻害における Tryp-Apt の濃度依存性

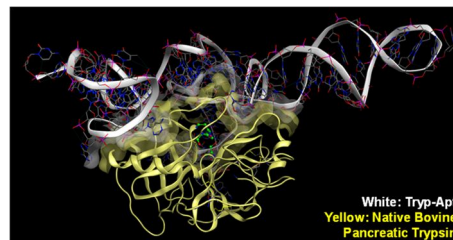


図 3 Tryp-Apt とウシトリプシンの複合体の推定構造

### (2) Tryp-Apt と pmDNA によるトリプシン活性の Off-On 制御

図 4 は、37°Cにて、L-BAPNA 存在下、トリプシン活性が発現した反応系に、Tryp-Apt を添加し所定時間経過後、Tryp-Apt と相補的塩基対を形成する pmDNA を添加した際の 405 nm の吸光度変化をモニターした結果である。なお、405nm の吸光度は、L-BAPNA の加水分解に伴い遊離する p-nitroaniline によるものであり、トリプシンの酵素活性と正の相関を示す。図 4 において、吸光度が変化しない時間が Tryp-Apt 添加による酵素活性阻害時間であり、その後の吸光度の増加は、pmDNA 添加による酵素活性の回復を示す。図に示すように、活性状態であるトリプシンに Tryp-Apt を添加することで、速やかに、酵素反応を停止させることが可能であった。また、活性の OFF 時間に係わらず、pmDNA の添加による活性の回復は速やかであった。表 1 は、pmDNA 添加後の酵素活性回復率をまとめたものである。Tryp-Apt による阻害時間が長いほど酵素活性の回復率は低下する傾向があるものの、検討した阻害時間の範囲において高い酵素活性回復率を示した。なお、Tryp-Apt による活性阻害時間の増加に伴う活性回復率の低下は、トリプシンの Tryp-Apt との相互作用時においてもわずかに進行する基質の分解反応に起因するものと考えている。なお、これらの結果より、pmDNA 添加による酵素活性の回復は想定していた通り、図 5 示すように、トリプシンと相互作用している Tryp-Apt が pmDNA と二本鎖 DNA を形成することで、トリプシンから解離するため考えている。

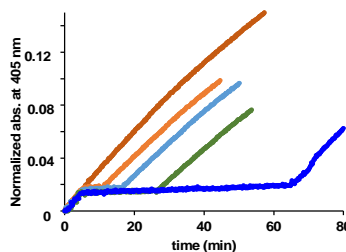


図 4 Tryp-Apt 添加による酵素活性の OFF、および、その後の pmDNA 添加によるトリプシン活性の回復挙動

表 1 Tryp-Apt による阻害時間が pmDNA 添加後のトリプシン酵素活性に与える影響

Inhibition time	Activity (μM/min)	Recovery (%)
(free trypsin ( ))	(0.61)	—
5 min ( )	0.55	89.4
10 min ( )	0.55	89.1
20 min ( )	0.54	87.5
60 min ( )	0.53	86.5
180 min	0.50	82.1

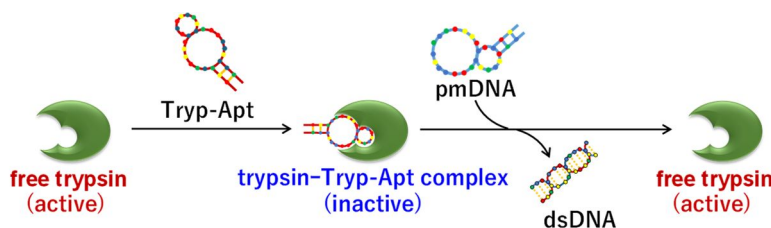


図 4 pmDNA 添加によるトリプシン活性の回復機構の予想スキーム

### (3) Tryp-Apt をリムーバブルマスク剤とするトリプシンの高分子修飾

高分子に pNipaam を用い、図 1 のスキームによる酵素の高分子修飾を検討した。ここでは、合成した pNipaam 修飾トリプシンについて、トリプシンの基質が多くの場合高分子であることから、基質にアゾ色素を導入したカゼイン (アゾカゼイン) を基質に用いて評価した。

図 5 は Tryp-Apt 存在下および非存在下でトリプシンの pNipaam 修飾を実施ものの酵素活性を示している。Tryp-

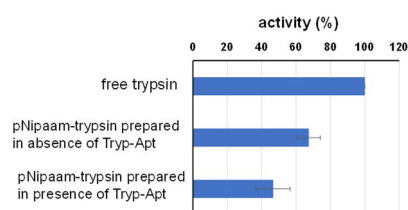


図 5 pNipaam 修飾トリプシンの酵素活性

Apt非存在下で高分子修飾したトリプシンと比較して、Tryp-Apt存在下で高分子修飾したトリプシンにおいて高い活性が認められ、図1に示した酵素修飾法の実現可能性と有用性を示すことができた。一方、修飾トリプシンは、アプタマー非共存下で高分子修飾した系よりは改善されるが、高分子修飾により一定の酵素活性の低下が認められた。今後、アプタマー側の最適化（塩基配列の再選定や断片化）、および、酵素の高分子修飾のための反応最適化が必要と考えられる。

以上より、アプタマーを酵素活性部位のマスク剤とするトリプシンの高分子修飾法の確立は達成できたものの、その利用や応用のためには更なる検討が必要と考えている。一方、アプタマーとその相補的塩基配列を持つオリゴDNAを用いた、酵素活性のON/OFF制御については、興味深い知見が得られ、かかる機能性酵素を用いた治療やDDSへの応用も検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasushi Sasai, Masao Morita, Aoi Isono, Shin-ichi. Kondo
2. 発表標題 Characterization of a DNA Aptamer as a Removable Trypsin Inhibitor
3. 学会等名 第32回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹井泰志、磯野蒼、近藤伸一
2. 発表標題 トリプシンに対する核酸アプタマーのリムーバブルマスク剤としての応用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹井泰志
2. 発表標題 バイオセンサーの基本設計とDLCの活用の可能性
3. 学会等名 日本医用DLC研究会 第5回総会研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯野 蒼  (Isono Aoi)  (50880481)	岐阜医療科学大学・薬学部・助教    (33708)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	近藤 伸一  (Kondo Shin-ichi)  (90240944)	岐阜薬科大学・薬学部・教授     (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関