

| | |
|----------|--------------------|
| ディビジョン番号 | 8 |
| ディビジョン名 | 生体機能関連化学・バイオテクノロジー |

| | |
|-----|------------------|
| 大項目 | 1. 生体機能関連化学 |
| 中項目 | 1-10. 酵素機能分子 |
| 小項目 | 1-10-2. 人工ヌクレアーゼ |

| | |
|--|--|
| <p>概要（200字以内）</p> <p>Ce(IV)/EDTA 錯体（DNA を切断する触媒）と PNA（DNA 中の特定の場所を認識する分子）とをハイブリッド化することにより、人工制限酵素が開発された。使用する PNA の配列や長さには制限がないので、どんなに大きな DNA であっても所定の場所で選択的に切断できる。したがって、これまで不可能とされていた“巨大 DNA の遺伝子操作”を含む次世代バイオテクノロジーの有力なツールとなることが期待される。</p> | |
| | |
| <p>現状と最前線</p> <p>現在のバイオテクノロジーでは、DNA を切断するのに各種の制限酵素が使用されている。しかし、天然の制限酵素が切断できる位置は限られており、また巨大な DNA を切断すると無数の断片が生じてしまう。つまり天然制限酵素では高等生物の DNA を遺伝子操作することはできず、また、小さな DNA を取り扱う際にも、近傍に制限酵素の切断サイトがあることが必要である。このような障害を取り除き、バイオテクノロジーをさらに大きな発展させるためには、巨大な DNA をも狙い通りの位置で切断できるツールが必要である。</p> <p>ごく最近、この目的を達成する人工制限酵素が開発された。この人工ツールは、（1）DNA を迅速に加水分解する触媒能を持つ Ce(IV)/EDTA 錯体 と、（2）ペプチド核酸（PNA；ペプチド結合を主鎖にもつ合成核酸）の2つの要素から構成される。Ce(IV)/EDTA 錯体は高い基質特異性を持ち、1本鎖状態の DNA のみを迅速に加水分解する（2重らせん構造の DNA はほとんど切断しない）。一方、2本の PNA と DNA とを混ぜると、DNA の2重らせんが解離し、それに伴って2組の PNA/DNA 2本鎖が形成し、DNA の中に PNA が“インベージョン”する。そこで、これら2つの要素を組み合わせると人工制限酵素が構築される。</p> <p>DNA の位置選択的切断の概略を挿入図に示す。まず、DNA（黒色線）の2本の鎖の中で、切断したい位置を決め、その場所に2本の PNA（灰色線）をインベージョンさせる。ここで、2本の PNA が結合する位置を少しずらしておき、切断したい場所だけが1本鎖構造になるよう</p> | |

に工夫する。すると、Ce(IV)/EDTA 錯体の基質特異性のために 1 本鎖構造となった部分だけが加水分解され、結局、DNA の 2 重らせんが所定の位置で選択的に切断される。使用する PNA は合成物でありその長さや配列は全く自由であるので、我々が切断したい場所にあわせて設計することができる。

この人工制限酵素の最大の特徴は、DNA がいかに大きくても、目的の場所で選択的に切断できることである。例えば、大腸菌ゲノム (460 万塩基対) を通常の制限酵素で切断すると 1000 箇所以上で切断が起きてしまうが、人工制限酵素を使えば 1 箇所で切ることができる。また、切断サイトが自由に設計できるために、従来法では困難であった遺伝子操作も容易に実現できる。例えば、複数の遺伝子を直列に連結して、これらのタンパクが直結した融合タンパクを構築するとしよう。ここで鍵となるのは、前方に来る遺伝子の終止コドンの直前をいかにして正確に切断するかである。それは、終止コドンの後方で切って連結するとタンパク合成はここで止まってしまうし、また、終止コドンのずっと手前で切断してしまうとタンパク機能が損なわれてしまうからである。もちろん、天然制限酵素の切断サイトは多くの場合この場所には存在しないので何らかの工夫が必要となる。しかし、人工制限酵素はどこでも好きな場所が切れるので、この問題を苦もなく解決できる。実際に、こうして調製した融合遺伝子は哺乳動物の細胞内で正常に発現し、十分な機能を発揮した。

このように、人工制限酵素は、(1) 巨大な DNA でも所定の 1 箇所で選択的に切断でき、しかも (2) 認識配列や認識特異性が使用目的に応じて自由に変えられる。したがって、高等生物のゲノムを対象とした遺伝子操作をはじめとする広範な分野に活用されることが期待される。

将来予測と方向性

- ・ 5 年後までに解決・実現が望まれる課題
 1. 人工制限酵素の選択性と位置特異性の一層の向上
 2. ウイルスや大腸菌程度の大きさのゲノムの操作技術の完成
 3. 2 を活用した新規ベクターの構築や遺伝子治療などへの応用
- ・ 10 年後までに解決・実現が望まれる課題
 1. 高等生物の巨大 DNA の操作技術の完成
 2. 当該技術の医療・工学への応用

キーワード

人工制限酵素、DNA、ペプチド核酸 (PNA)、遺伝子組み換え

(執筆者： 小宮山 眞)