

1. 研究課題名：スーパー制限酵素による巨大DNAの遺伝子操作

2. 研究期間：平成18年度～平成22年度

3. 研究代表者：小宮山 真（東京大学・先端科学技術研究センター・教授）

#### 4. 研究代表者からの報告

##### (1) 研究課題の目的及び意義

バイオテクノロジーの著しい発展の中で、ゲノムDNAをはじめとする巨大DNAを正確にマニピュレーションする技術の重要性が高まっている。ゲノムDNAから所定の遺伝子（群）を切り出し、またゲノムDNAの所定位置に必要な遺伝子を自在に導入することができれば、医療、物質生産、品種改良など幅広い分野に計り知れない効果をもたらすと期待される。しかし、巨大DNAの切断に天然の制限酵素を使用すると、位置特異性が不十分であるために極めて多数の箇所では切断され、これを遺伝子操作することは不可能であった。

我々は長年にわたってこの問題の解決法を迫及してきたが、数年前に世界に先駆けて、巨大な2本鎖DNAを所定の位置で選択的に切断するスーパー制限酵素（ARCUT、Artificial Restriction DNA Cutter）の開発に成功した。この人工ツールは（i）2本鎖DNAの所定位置に侵入（インバージョン）する2本のペプチド核酸（PNA）と（ii）PNAの両側の1本鎖部位を選択的に切断するCe(IV)/EDTA錯体から構成される。最大の特徴は、PNAの配列と長さを規定することにより、切断位置ならびに位置特異性が自在に設計できることである。特別推進研究では、（1）スーパー制限酵素を用いた巨大DNAの切断法を確立すること、および（2）スーパー制限酵素を活用したニュー・バイオテクノロジーを創出することを目的として研究を進める。

##### (2) 研究の進展状況及び成果の概要

本年度までに、ARCUTに関する基礎的な知見を集積し、また、ARCUTのバイオへの応用を指向した様々な研究を開始した。具体的には、以下の通りである。

得られた成果としては、（1）ギャップ近傍をリン酸系の新規な配位子で修飾することに成功し、これを用いて一本鎖DNAの目的部位を切断することに成功、（2）PNAの主鎖に正電荷を導入することにより、未修飾のPNAと比較して著しくインバージョン効率を向上させることに成功、（3）インバージョン効率の向上のための新たな手法として、二本のPNAをグルタルアルデヒドで架橋することが有用であることを発見、（4）PNA修飾用の糖鎖モノマーの合成に成功、（5）従来型のPNAを利用したARCUTについて、これをツール化するため必要な基礎情報（正確な切断位置の決定、リゲーション効率の向上など）の収集、（6）アデノウィルスベクターを一か所で切断することに成功、（7）ARCUTのバイオテクノロジー・ツールとしての有用性を、緑色蛍光タンパクから青色蛍光タンパクへの遺伝子変換実験を行うことで実証などが挙げられる。

また、（8）大腸菌のゲノムDNAの所定の遺伝子の切り出しならびにクローニング、（9）ミトコンドリアDNAの遺伝子操作、（10）ARCUTを用いた新規タンパク質セレクション法の開発などに着手した。さらに、（11）BACベクターに導入された対象遺伝子領域のエンハンサーをARCUTで解析する手法の開発、（12）ARCUTでゲノムDNAを切断することによる相同組換えの効率化などについても共同研究を開始した。

以上のように、本研究はきわめて順調に進んでおり、期間内には十分な成果を挙げられるものと考えている。

#### 5. 審査部会における所見

##### A（現行のまま推進すればよい）

本研究課題は、研究代表者が長年にわたって進めてきた化学的DNA切断法を成熟させ、さらにそれを応用展開することを目的としている。研究代表者が今まで暖めてきた種々のアイデアが一挙に噴出している感があり、どの研究テーマも良く計画が練られ、達成に向けて順調に研究が進んでいる。また国内外に類例的な研究がほとんどなく、このグループの独走状態であり、本研究課題の先端性と重要性を示している。購入備品類は既設の機器類と合わせて大いに利用されており、博士研究員の雇用等も順調であることから、現行のまま推進すればよいと判断した。