

1125 絹タンパク質セリシンの動物細胞培養への効果

○寺田 聡¹，柳原佳奈¹，武村和彦¹，斉藤恭行¹，三木正雄¹，佐々木真宏²，山田英幸² (¹ 福井大・生応化，² セーレン)

糖鎖付与などのために、医薬品等の生理活性蛋白の多くは、大腸菌ではなく、動物細胞によって生産されている。しかしながら動物細胞培養においては、牛胎仔血清、あるいはタンパク因子の添加が必須となる場合が多い。それゆえ、培養コストが高額となったり、不純物を多数含むことから目的物質の精製が困難になるなどの問題を生じている。さらに、BSE の懸念もあり、哺乳動物由来の因子を用いることは、避けるべきである。本研究では、動物細胞培養での培地添加因子の代替として、新規なものを提案する。すなわち、増殖支持因子として、カイコ繭由来のセリシタンパク質の可能性を検討した。

セリシンによる増殖促進効果は、広い細胞系統にわたって観察された。すなわち、ハイブリドーマ細胞やヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト由来肝癌細胞株 HepG2、さらにウイルススペクター調製用のヒト胎児腎由来細胞株 293 に対しても増殖促進が認められた。さらに、ハイブリドーマ細胞株の抗体産生についても、セリシン存在下で増強された。続いて、セリシンが化粧品に有効であることから、界面活性剤による細胞へのダメージを中和する効果があるのではないかと期待し、ウサギ由来の RC4 細胞への効果を検討した。結果、セリシンは種々の界面活性剤による細胞死滅を軽減する中和効果を示した。

Effect of sericin derived from Bombyx mori on mammalian cell culture

○ Satoshi Terada¹，Kana Yanagihara¹，Kazuhiko Takemura¹，Yasuyuki Saitoh¹，Masao Miki¹，Masahiro Sasaki²，Hideyuki Yamada² (¹ Fukui Univ.，² Seiren Co.)

Key words sericin, mammalian cell culture, proliferation, silk, Bombyx mori, medium

1127 遺伝子組換え CHO 細胞におけるヒト antithrombin III 生産 —アンチセンスによる糖鎖修飾の制御—

○安藤真之¹，高橋晶子¹，片倉啓雄¹，岸本通雅¹，菅 健一¹，大政健史¹，三木秀夫²，應田豊雄²，小林 薫² (¹ 阪大院・工・応生，² 三菱ウェルファーマ)

【目的】ヒト血液由来製剤である血液凝固調節糖蛋白質 AT III は、安全性の確保のため遺伝子組換え動物細胞による生産が求められている。AT III 生産における糖鎖構造制御を目的として、フコースを糖鎖に結合させる酵素である α 1,6-fucosyltransferase(FUT8)細胞内活性を変化させた細胞株構築を試みた。

【結果及び考察】細胞株としてヒト AT III 産生組換え CHO 細胞を用いた。CHO 由来 FUT8cDNA を RT-PCR 法により単離し、その塩基配列を決定し、既存 4 種 (ヒト、ブタ、マウス、ウシ) の FUT8 遺伝子の配列と比較した結果、90% 以上の相同性があった。細胞内 FUT8 活性を変化させるため、CHO 細胞に FUT8 及び anti-FUT8 遺伝子を導入した。その結果、FUT8 導入株の中から、活性が 1.4 倍に上昇した株、anti-FUT8 導入株の中から、0.7 倍に減少した株を構築することができた。これより、向きを変えた FUT8 遺伝子の細胞への導入により、細胞内 FUT8 活性を制御できることが示された。

Control of glycosylation in human antithrombin III production

○ Masayuki Ando¹，Akiko Takahashi¹，Yoshio Katakura¹，Michimasa Kishimoto¹，Kenichi Suga¹，Takeshi Omasa¹，Hideo Miki²，Toyoo Ohda²，Kaoru Kobayashi² (¹ Div. Biotech., Osaka Univ., ² Mitsubishi pharma)

Key words CHO, FUT8, AT III, glycosylation

1126 Effects of glutathione and iron chelators on level of intracellular reactive oxygen species

○ Zhanyou Yun, Mutsumi Takagi, Yoshida Toshiomi (ICBiotech, Osaka Univ.)

【Objective】To study the inhibition pathway of apoptosis, the effects of the reduced form of glutathione (GSH) and iron chelators on the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) in CHO cells were investigated.

【Method】After their growth in Ham's F12 medium containing 10% newborn-bovine serum (NBS), CHO cells (2×10^5 cells/ml) were maintained in suspension in a spinner bottle for 6 days employing serum-free Ham's F12 medium with 10 mM GSH or iron chelators of deferoxamine (10 μ M) and aurointricarboxylic acid (50 μ M). The number of viable cells and the intracellular ROS level were determined by the trypan-blue method and the staining with H₂DCFDA (6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate di(acetoxymethyl ester)), respectively.

【Results】The addition of GSH to the serum-free culture of CHO cells apparently lowered the intracellular ROS level as well as the addition of serum to the culture by 0.4, 10%, respectively. The addition of iron chelators to the serum-free culture also decreased the intracellular ROS level independent of the effect of GSH. These iron chelators as well as GSH also increased the residual concentration of viable cells during the serum-free maintenance culture. These results suggest that GSH and iron chelators can suppress the apoptosis of CHO cells during serum-free culture by lowering the intracellular ROS level.

Effects of glutathione and iron chelators on level of intracellular reactive oxygen species

○ Zhanyou Yun, Mutsumi Takagi, Yoshida Toshiomi (ICBiotech., Osaka Univ.)

Key words apoptosis, CHO, glutathione, ROS, chelator, deferoxamine

1128 抗体受容体キメラ CDR へのコンビナトリアル変異導入による，抗原により増殖抑制される細胞の創出

石井慎一¹，○上田 宏²，河原正浩¹，津本浩平³，熊谷 泉³，長棟輝行¹ (¹ 東大院・工・化生，² 東大院・新領域・先端生命，³ 東北大・院工・生工)

【目的】我々はすでに、抗原により安定化される抗体 Fv と、エリスロポエチン受容体 (EpoR) あるいは gp130 とのキメラを発現させ、IL-3 あるいは IL-6 依存性細胞に抗原依存的増殖応答を誘導することに成功している。今回、抗原認識特異性に深く関与する CDR 領域をランダム化し、その抗原応答がどう変化するか検討した。

【方法】抗エワトリリゾチーム (HEL) 抗体 HyHEL-10 の VH，EpoR 細胞外ドメイン 2，gp130 細胞内ドメインを結合させたキメラ遺伝子をコードするレトロウィルスベクター pMX-Hg，およびこの VH CDR2 の 4 残基をランダム化したライブラリを作製した。これを予め VL-EpoR キメラを発現させた IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に導入し、IL-3 非存在下で抗原存在下，非存在下で選択を行った。

【結果】10⁶ の多様性を持つライブラリ導入細胞より、IL-3,HEL 非存在下でも増殖可能な細胞株 6 種を得た。この中に、野生型 pMX-Hg 導入株と逆に HEL 濃度依存的に増殖が抑制されるクローンが 2 種あった。Genomic PCR により VH 遺伝子を回収し、これを繊維状ファージに提示し、VL との結合を観察 (open sandwich assay) した所、変異体は野生株よりむしろ高い HEL 濃度依存的結合を示した。

【結論】同一抗原を用いて負の増殖応答を起こす受容体を創製できた。Fv の抗原依存的安定化能自体は保たれていることから、この変化は変異による微妙なコンフォメーション変化による可能性がある。

Reversal of antigen-dependent cell growth through the CDR mutagenesis of antibody-receptor chimera

Shin'ichi Ishii¹，○ Hiroshi Ueda²，Masahiro Kawahara¹，Kouhei Tsumoto³，Izumi Kumagai³，Teruyuki Nagamune¹ (¹ Dept. Chem. Biotech., Sch. Eng., Univ. Tokyo,² Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo,³ Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody engineering, combinatorial library, cell growth, cytokine receptor, retroviral vector