1Kp15 Chinese hamster ovary 細胞における ATF4 または GADD34 過剰発現によるタンパク質生産性向上

○西沢 明敏¹, 高見 貴之¹, 大屋 智資², 本田 孝祐¹,
大政 健史¹, 大竹 久夫¹
(¹ 阪大院・工・生命先端, ² 田辺三菱製薬(株))

【目的】 抗体医薬等のバイオ医薬品の生産系には Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に代表される本来の発現系に近い動物細胞を宿主として用いる必要がある。動物細胞培養による物質生産においては、単位細胞当たりの生産性を向上させることが重要な点である。本研究では、小胞体ストレス応答により活性化される転写因子を過剰発現させることによる組換えタンパク質の生産性向上とそのメカニズムの解明について検討した。

【方法、結果及び考察】 遺伝子増幅を用いて構築された human antithrombin-III(hAT-III)を高レベルで分泌生産する CHO13D-35D 細胞株を実験材料として用いた。CHO13D-35D株に翻訳の促進を誘導する転写因子である activating transcription factor 4 (ATF4) を過剰発現させることにより hAT-III 生産性の向上が見られた。ATF4 は growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34) を誘導し、GADD34 は翻訳抑制を解除するため、翻訳が促進されたと考えられた。そこで構築した細胞株における GADD34 の発現解析、ならびに eIF2 α の脱リン酸化解析を行うとともに、GADD34 過剰発現株を構築し、hAT-III の生産性向上に関するメカニズムについて解明した。

【引用文献】

- 1) Ohya T *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, **100**:317-324 (2008).
- 2) Omasa T *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**:568-573 (2008).

Effect of overexpression of ATF4 and GADD34 on the human anti-thrombin-III production in Chinese hamster ovary cells

○Akitoshi NISHIZAWA¹, Takashi TAKAMI¹, Tomoshi OHYA²,
Kohsuke HONDA¹, Takeshi OMASA¹, Hisao OHTAKE¹
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Mitsubishi Tanabe pharma)

Key words Chinese hamster ovary (CHO), ER stress, activating transcription factor 4 (ATF4), growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34)

1Kp18 Cre recombinase mediated site-specific genetic modification of target cells using integrase-defective retroviral vectors

○Shuohao HUANG¹, Yoshinori KAWABE², Akira ITO²,
Masamichi KAMIHIRA^{1,2}
(¹Grad. Sch. Systems Life Sci., Kyushu Univ., ²Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

(Objective) After many years of research, application of retroviral vectors is still hampered by safety issues such as insertion mutagenesis, which is attributable to the random integration property of retroviruses. Retroviral integrase is responsible for the integration processes, and a single mutation in its core domain has been shown to severely compromise the integration ability, leading to the appearance of large amount of non-integrable, circular retroviral cDNA in the nuclei of infected cells. We therefore attempted to use those cDNA as substrate for Cre to achieve site-specific genetic modification of target cells.

(Methods and Results) One docking site containing an ATG codon and a pair of wild type and mutated loxP sites was first introduced into target cells via normal retroviral infection at low MOI. An ATG-deficient neomycin selection gene together with a compatible pair of loxP sites was engineered into another viral vector for the production of integrase-defective retroviral vector (IDRV). The results indicated that, in the presence of Cre, effective recombinase mediated cassette exchange occurred after infection with IDRV, resulting in the appearance of G418-resistant colonies. The site-specific modification of cellular genome was confirmed by PCR analysis on selected clones. The substitution of original viral integration machinery to nonviral ones should be able to open new ways for the engineering of retroviral vectors.

Cre recombinase mediated site-specific genetic modification of target cells using integrase-defective retroviral vectors

○Shuohao HUANG¹, Yoshinori KAWABE², Akira ITO²,
Masamichi KAMIHIRA^{1,2}
(¹Grad. Sch. Systems Life Sci., Kyushu Univ., ²Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Cre recombinase, Integrase-defective retroviral vector, Recombinase mediated cassette exchange

1Kp16 血管新生因子を遺伝子導入した細胞シートの作製と評価

○秋山 裕和, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道
(九大院・工・化工)

【目的】 近年、再生医療分野において、組織工学技術の開発が重要となっている。しかし、生体外で作製した組織は血管を有していないため、移植直後の酸素・栄養の供給には限界があり、組織の生存・定着率が著しく減少する可能性がある。そこで、本研究では、磁気遺伝子導入技術 (Magnetofection) と磁気三次元組織構築技術 (Magnetic force-based tissue engineering, MagTE) を組み合わせることで血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を遺伝子導入した細胞シートを構築し、移植実験による血管新生能に関する評価を行った。

【実験方法及び結果】 磁性ナノ粒子でレトロウイルスベクターを標識し、磁力により筋芽細胞株 C2C12 細胞に接触させたところ、従来法の6倍以上の高効率で遺伝子導入に成功した。さらに、VEGF 遺伝子導入 C2C12 細胞を用いて、Mag-TE 法により細胞シートを作製し、ヌードマウスへの皮下移植実験を行ったところ、移植2週間後の組織において、コントロールと比較して毛細血管網の密度および組織の厚みが顕著に増大していた。これらの結果から、磁力を用いた遺伝子導入手法および組織構築技術は、組織工学において有用な手法であると考えられる。

Fabrication and evaluation of angiogenic gene-modified cell sheets

○Hirokazu AKIYAMA, Akira ITO, Yoshinori KAWABE,
Masamichi KAMIHIRA
(Dept. Chem. Eng. Faculty of Eng. Kyushu Univ.)

Key words Angiogenesis, VEGF, Magnetofection, Tissue engineering

1Kp19 GFP をモデルタンパク質としたカイコ - バクミド発現系の評価

○辻 由隆¹, 加藤 竜也¹, 李 在萬², 日下部 宜宏², 朴 龍洙^{1,3}
(¹ 静大・農・応生化, ² 九大院・農, ³ 静大創科院・バイオサイエンス)

【目的】 カイコを宿主としたタンパク質発現系は発現量の多さ、高度な翻訳後修飾による高い活性、容易なハンドリングなどから期待が高まっているが、遺伝子組換えには煩雑な操作や時間を要し、汎用的な使用には至っていない。そこで組換え作業を大腸菌で行える BmNPV バクミド系は、ハイスループット系として注目されている。本研究では、BmNPV バクミド及其の改変型バクミドを用い、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を4品種のカイコで発現させ、カイコ遺伝子発現系における発現能力の評価を目的とした。

【方法及び結果】 野生型バクミド (WT)、目的タンパク質の分解を防ぐ目的でウイルス由来のシステインプロテアーゼ欠損 (CP-) バクミド、システインプロテアーゼおよびキチナーゼ両欠損 (CP-Ch-) バクミドに GFP 遺伝子を導入したバクミドを構築した。これをカイコ5齢幼虫に接種して、GFP 発現量の経時変化を調べた。また、4品種のカイコを用いて同様に GFP を発現させ、発現量の違いを調べた。その結果 WT、CP-、CP-Ch- のいずれのバクミドにおいてもカイコの致死期に最大の発現量となり、カイコ1個体の脂肪体中、WT でおよそ 2.4mg、CP- で 4mg、CP-Ch- では 5mg の GFP が発現することがわかった。また、品種を変えた実験では、最大でカイコ1個体当たり 10 mg 程度の GFP 発現が確認され、大量発現系としてカイコバクミド発現系の有効性は明らかとなった。

Evaluation of Silkmoth-Bacmid Expression System

○Yoshitaka TSUJII¹, Tatsuya KATO¹, Jae Man Lee²,
Takahiro KUSAKABE², Enoch Y. PARK^{1,3}
(¹Dept. Appl. Boil. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch., Agric., Kyushu Univ., ³Biosci. Sect., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words BmNPV, Bacmid, *Bombyx mori*, GFP