

2Ka05 CHO 細胞浮遊培養における魚血清の添加濃度と熱処理の影響

○藤原 政司¹, 会津 悠¹, 塩谷 格², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²日本水産(株)中央研)

【目的】ヒトに感染するウイルスが報告されていない魚血清 (FS) を安全上の問題のあるウシ胎仔血清 (FCS) の代わりにCHO細胞の接着培養に用いたところ、熱処理したFSを低濃度添加した場合顕著な細胞増殖が見られた。しかし、FSは細胞接着を阻害することから、細胞接着を必要としない浮遊培養へのFSの利用を考え、FSの添加濃度と熱処理がCHO細胞の浮遊培養における増殖に与える影響を検討した。
【方法】マダイまたはブリからFSを調製し、必要に応じて熱処理 (56℃、30分) した。FS (ブリ) またはFS (マダイ) を所定濃度または10% FCSを含むHam's F-12K培地を用いて、組換えCHO細胞 1-15500 (ATCC CRL-9606)株をスピナーフラスコに播種 (2×10⁵ cells/ml) し、37℃、5% CO₂ 雰囲気下、攪拌速度70 rpmで3~4日間浮遊培養した。細胞数はトリパンブルー法で測定した。
【結果と考察】熱処理したFS (ブリ) の添加濃度を1, 2, 4%に変えて培養したところ、血清濃度が高いほど細胞密度が高かった。また、熱処理した10% FS (マダイ) 培地および未処理の10% FS (マダイ) 培地では培養72 hでほぼ同じ細胞密度 (8×10⁵ cells/ml) に達し、両者の間に明確な差異が見られなかった。このように、浮遊培養においてはFS添加濃度を低く抑えたり、FSを熱処理する必要がないことがわかった。

Fetal calf serum-free suspension culture of Chinese hamster ovary cells employing fish serum

○Masashi FUJIWARA¹, Yu AIZU¹, Itaru SHIOYA², Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Cent. Res. Lab., Nippon Suisan Kaisha, Ltd.)

Key words Chinese hamster ovary cells, fish serum, suspension culture

2Ka08 ニワトリ卵管特異的高発現のための合成プロモーターシステムの開発

○山元 秀晃, 沼田 健作, 寺森 正志, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
(九大院・工・化工)

【背景・目的】我々はこれまでに、トランスジェニック鳥類の卵を含めた全身で組換えタンパク質を高発現させることに成功している。しかし、より多様なバイオ医薬品を生産するトランスジェニック鳥類の作製には、生体への影響を考え、卵白をつくる卵管組織特異的に目的タンパク質を発現させる必要があり、また、その発現はより高発現であることが望まれる。本研究では、卵管組織で発現しているタンパク質のプロモーター領域を用いて卵管特異的な発現を実現し、さらにTRE-tTA合成プロモーターシステムと組み合わせ、tTA トランスアクチベータータンパク質発現のポジティブフィードバック作用を働かせることで、高発現を達成することを試みた。
【実験方法・結果】ポジティブフィードバック発現システムの作用を評価するために、tTA発現ユニットと共にTRE-tTA発現ユニットを導入し、β-gal 活性測定を行った結果、約22倍の発現量増加が見られた。卵管組織特異的な発現のために、TRE配列下流にあるプロモーター配列をオボアルブミンあるいはコンアルブミン最小プロモーターと置換したところ、発現リークが解消されると共に、卵管細胞特異的な発現が可能となった。また、この卵管特異的なプロモーターによる発現では、ポジティブフィードバック作用で、卵管細胞において約8.2倍の発現量増加が達成された。これらの結果から卵管特異的な人工合成プロモーターを用いた本発現システムが卵管特異的な高発現をもたらすことが示された。

Development of artificial synthetic promoter system for oviduct-specific gene expression in transgenic avian

○Hideaki YAMAMOTO, Kensaku NUMATA, Masashi TERAMORI, Yoshinori KAWABE, Akira ITO, Masamichi KAMIHIRA
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Oviduct-specific expression, transgenic avian, positive feedback

2Ka06 逐次遺伝子組込みシステムによって作製した動物細胞を用いた組換え抗体生産

○河邊 佳典, 槇坪 寛勝, 亀山 雄二郎, 井藤 彰, 上平 正道
(九大院・工・化工)

【背景・目的】遺伝子組換え動物細胞を用いてバイオ医薬品などの物質生産を行う際、薬剤耐性遺伝子や核酸合成遺伝子などの選択マーカーを用いることで目的遺伝子を細胞のゲノム染色体に挿入して安定形質転換体を樹立している。しかし、この方法は、確実性に欠け、選抜に長期間を要することが問題となっている。我々はこれまでに組換え酵素Creにより動物細胞染色体上で配列部位特異的に逐次遺伝子組込みのできるシステムを開発してきた。本研究では、このシステムを用いて組換え抗体遺伝子の発現ユニットを染色体上に逐次遺伝子組込みすることで組換え抗体の発現増幅を行い、導入遺伝子数と生産性の関係について解析した。
【実験方法・結果】独立して機能する3種類のスパーサー変異を含むloxP配列を選抜し、各loxP配列、選択マーカー、組換え抗体遺伝子発現ユニットを有するプラスミドを作製した。次に選抜したloxPサイトが染色体に組込まれたCHO細胞を樹立し、Cre発現ベクターと目的遺伝子を有するプラスミドを遺伝子導入することで、染色体へ組換え抗体遺伝子の逐次遺伝子組込みを行った。染色体上での遺伝子導入を解析したところ、複数の組換え抗体遺伝子発現ユニットが部位特異的に組込まれていることがわかった。また、抗体発現を評価した結果、組込まれている発現ユニット数に伴い抗体生産量の増加が見られた。これらの結果から、本システムは動物細胞における組換えタンパク質の発現増幅に有効であることが示された。

Recombinant antibody production using animal cells generated by an accumulative gene integration system

○Yoshinori KAWABE, Hirokatsu MAKITSUBO, Yujiro KAMEYAMA, Akira ITO, Masamichi KAMIHIRA
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Accumulative gene integration, Cre recombinase, Recombinant antibodies, Site-specific recombination

2Ka09 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療用エビトープペプチド含有タンパク質の生産

○沼田 健作¹, 山田 紀子², 林田 義文¹, 河邊 佳典¹, 井藤 彰¹, 上平 正道^{1,2}
(¹九大院・工・化工, ²九大院・シス生命)

【背景・目的】近年、花粉症の根治療法として、花粉抗原の代わりにT細胞エビトープを患者への投与に用いる新しい減感作療法が提案されており、より効果的で安全な治療法として注目されている。本研究では、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法により、スギ花粉抗原由来T細胞エビトープ含有タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製を行った。
【実験方法・結果】スギ花粉抗原由来ヒトT細胞エビトープを7つ集積させたエビトープ (7crp) をニワトリ卵白リゾチーム (cLys) と融合させた cLys-7crp をコードする遺伝子を設計し、ニワトリβアクチンプロモーターで発現調節するようレトロウイルスベクタープラスミドに組込んだ。作製したウイルスベクターを導入した動物細胞について、ウェスタンブロット法で解析した結果、目的タンパク質が適切に生産されていた。次に、超遠心により高力価に調製したウイルス溶液をニワトリ胚に注入し、遺伝子導入ニワトリを作製した。PCR法による解析の結果、目的遺伝子が細胞ゲノム内に導入されたことが確認できた。ニワトリの各組織についてcLys-7crpの発現解析を行ったところ、心臓でcLys-7crpの発現が確認できた。これらの結果から、遺伝子導入ニワトリによるcLys-7crpタンパク質の生産が可能であることが示唆された。

Production of therapeutic proteins including Japanese cedar pollen T-cell epitopes by genetically manipulated chickens

○Kensaku NUMATA¹, Noriko YAMADA², Yoshifumi HAYASHIDA¹, Yoshinori KAWABE¹, Akira ITO¹, Masamichi KAMIHIRA^{1,2}
(¹Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words Genetically manipulated chickens, transgenic avian bioreactor, T-cell epitopes, Japanese cedar pollen