

2Ea05 組換え酵素を用いた逐次遺伝子組み込みによる遺伝子組換え動物細胞の作製

○河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
(九大院・工・化工)
kawabe@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

遺伝子組換え動物細胞は、バイオ医薬品生産のための代表的なプラットフォームとして確立しており、組換えタンパク質の生産性を向上させることで、生産コストの低減が図られてきた。これまで、遺伝子発現ベクターの改良、生産細胞の育種、培養条件の検討や効果的な培養培地の開発などで、生産性の向上が行われてきた。導入遺伝子の高発現細胞株の構築においては、目的遺伝子と核酸合成系遺伝子などの選抜遺伝子をもつプラスミドを細胞に共導入した後、対応する薬剤濃度を上昇させながら目的遺伝子の発現ユニットのコピー数を増加させる、いわゆる「遺伝子増幅」が行われている。しかし、目的遺伝子の染色体への組み込みや増幅頻度は、用いるホスト細胞に強く依存しており、概して低効率である。そのため、多くの手間と労力をかけ、高い生産性を示す細胞を選抜している。さらに、目的遺伝子のゲノム上での導入部位は通常ランダムであるため、培養期間中に目的遺伝子の発現抑制を受ける場合もある。これらのことから、長期的・安定的に目的タンパク質の高生産細胞株を得るには、染色体上で導入遺伝子を安定に発現・保持できる部位における確実性の高い遺伝子多重化技術の開発が望まれている。我々はこれまで、部位特異的遺伝子導入法としてCre-loxPシステムを用いて、動物細胞染色体にあらかじめ組み込んだloxP部位に逐次的かつ酵素依存的に目的遺伝子を導入できる逐次遺伝子組み込みシステムを開発しており、この方法について紹介する。

Cre-loxP組換え反応では、組換え酵素Creが2つのloxP間で削除、挿入、置換、反転などの組換え反応を起こす。loxPは34 bpからなるDNA配列で、中央のスペーサー領域が2つの繰り返し回文配列（アーム領域）に挟まれた構造をもつ。我々は、アーム領域およびスペーサー領域における配列変異により反応の特性が改変可能であることを利用して、独立して機能するスペーサー変異を含むloxPにアーム変異を組み合わせ、不可逆な遺伝子導入が可能なloxPを複数選抜後、各loxPと目的遺伝子を有するプラスミドを作製し、Cre組換え反応による逐次遺伝子組み込みシステムを構築した。

遺伝子組み込みの起点となるloxPがあらかじめ染色体に導入されたCHO細胞を作製後、Cre発現ベクターと組換え用のloxPで挟まれたレポーター遺伝子（蛍光タンパク質）を有するプラスミドを遺伝子導入したところ、部位特異的に目的遺伝子が組み込まれていることをPCR解析で確認し、逐次組み込みに対応する蛍光タンパク質を検出できた。また、ゲノム中のloxP配列周辺をシークエンス解析した結果、期待される組換え反応が起きていることがわかった。次に、目的遺伝子を組換え抗体遺伝子発現ユニットとして逐次組み込み反応を行った。まず、あらかじめ組み込むloxPを赤色蛍光タンパク質遺伝子とともにCHO細胞へ導入し、赤色蛍光強度が高い細胞株を目的遺伝子組み込みのためのホスト細胞として選抜した。組換え抗体遺伝子を有するプラスミドを逐次遺伝子組み込みし、サンプル解析により部位特異的遺伝子導入を確認した。抗体遺伝子を導入した細胞を用いて生産性を評価したところ、導入した発現ユニット数に応じて抗体生産量の増加が見られた。

本システムでは、あらかじめ選抜された染色体上のホットスポット部位への遺伝子導入が可能であるため、高発現・高安定領域で限定された発現遺伝子数により高発現細胞株の取得が可能であると考えている。本演題では、発現ユニットの最適化や迅速な逐次遺伝子組み込み細胞株の取得法など我々の取り組みをふまえて、今後の展望について議論したい。

Recombinant protein production using animal cells generated by an accumulative site-specific gene integration system

○Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Accumulative gene integration system, Cre-loxP, Gene amplification

2Ea06 日本における細胞培養技術応用医療製品の開発と評価

○早川 堯夫
(近畿大・薬総研)
takao-hayakawa@mtg.biglobe.ne.jp

Some Aspects of Development and Evaluation of Biotechnology Medicinal Products in Japan

○Takao Hayakawa
(Pharm. Res. & Tech. Inst., Kinki Univ.)

Key words Biotechnology products, Cell Culture-derived products, R&D, Product evaluation & control