

# CHO細胞で高速・確実なタンパク質 生産を可能にするシステム

研究責任者：

渡邊孝明（自然科学研究機構 基礎生物学研究所 助教）

コーディネータ：

菅野幸一（公益財団法人 科学技術交流財団  
知の拠点重点研究プロジェクト統括部  
科学技術コーディネータ）

# 研究背景: 高品質タンパク質の需要拡大

ライフサイエンス分野で高品質タンパク質の需要が拡大している。

バイオ医薬分野の生産開発

抗体医薬、エリスロポエチン、インターフェロン等

診断薬分野の生産開発

多数の抗体や抗原タンパク質

研究分野の生産開発

抗体、プロテインチップ、結晶化用タンパク質試料

...糖鎖等の翻訳後修飾や高次構造を維持するには、動物細胞での生産が必要である。

例えば、昆虫細胞でも7回膜貫通型のGPCRを生産できない、プロセッシングされていないタンパク質が混入してしまう等の問題がある。

## 研究背景: 従来技術の問題点

従来は動物細胞が用いられ、生産性を高めるため遺伝子増幅現象が利用されてきたが...

- 増殖が遅く培養にコストや手間がかかる
- 高発現の細胞株樹立に1年近くを要する
- 高発現が長続きしない
- 増幅機構が未解明のため約30年間効率化できていない

...等の問題を抱え、開発・製造コストが高額である。

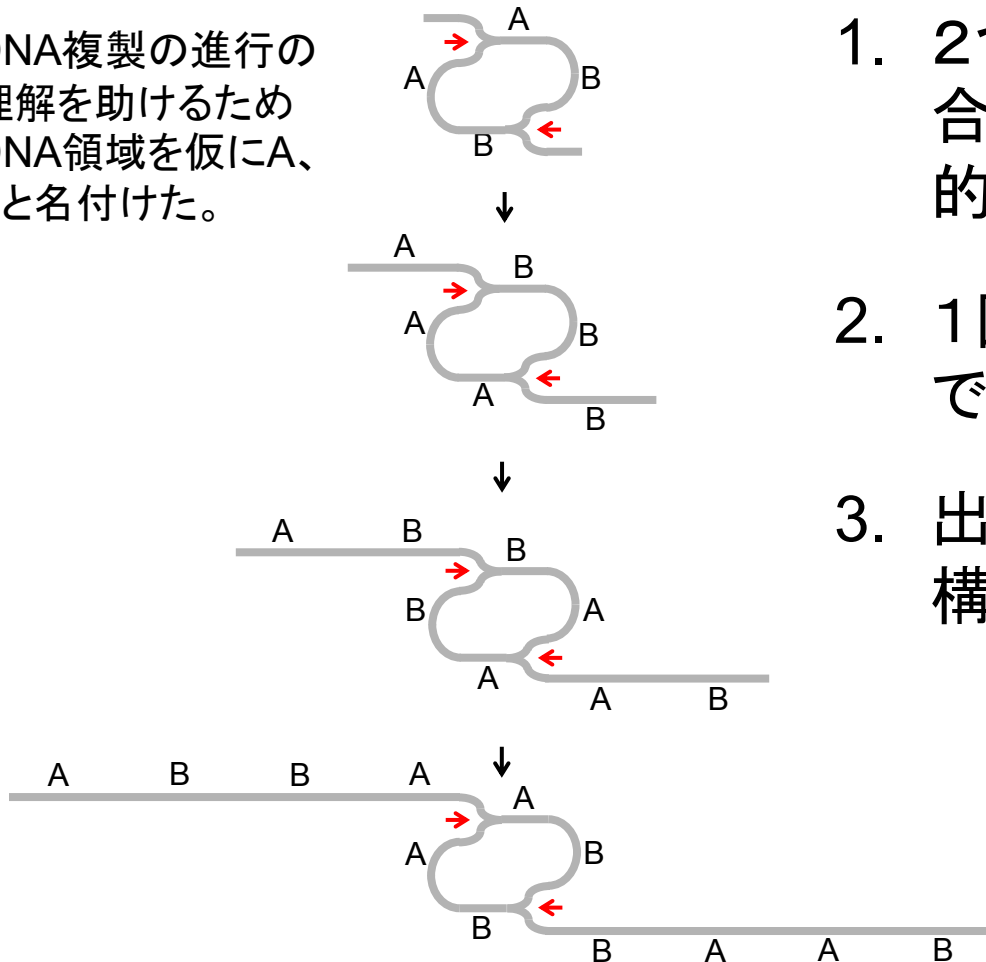


明確な増幅反応による高速・高効率な増幅系を目指した。

# ダブルローリングサークル型(DRCR)複製の特徴

複製フォーク(→):  
二本鎖DNAの複製が進行する部位。  
一本の親分子から二本の娘分子が  
でき、Y字型に描くことができる。

DNA複製の進行の  
理解を助けるため  
DNA領域を仮にA、  
Bと名付けた。

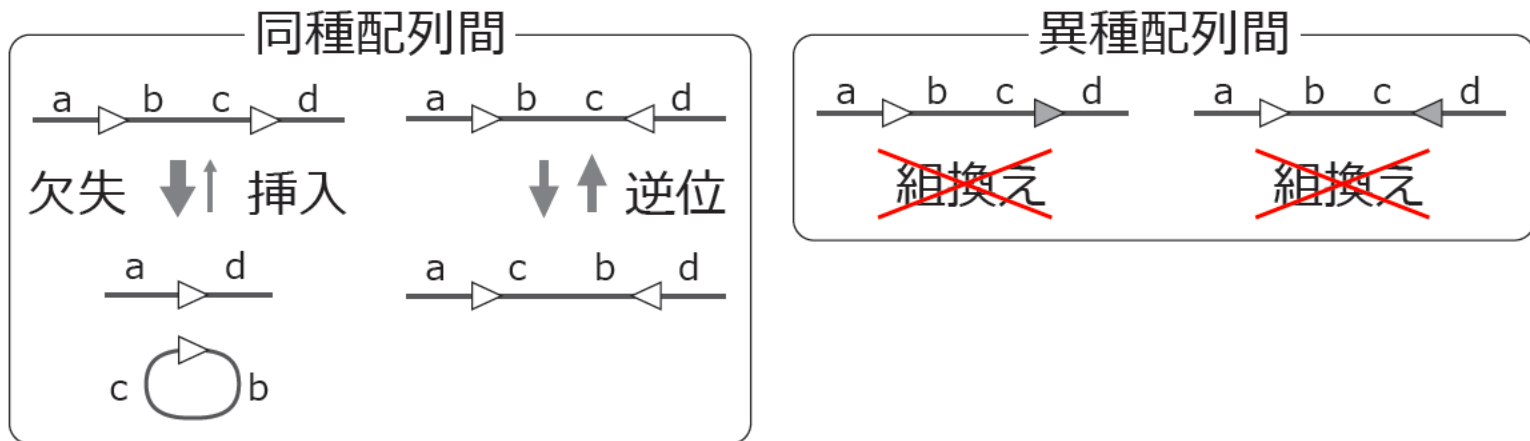


1. 2つの複製フォークが追いつくようにして環状DNAを連続的に複製する。
2. 1回の細胞周期でも高速に増幅できる。
3. 出芽酵母2 $\mu$ プラスミドの増幅機構として公知である。

# Cre-lox系とは

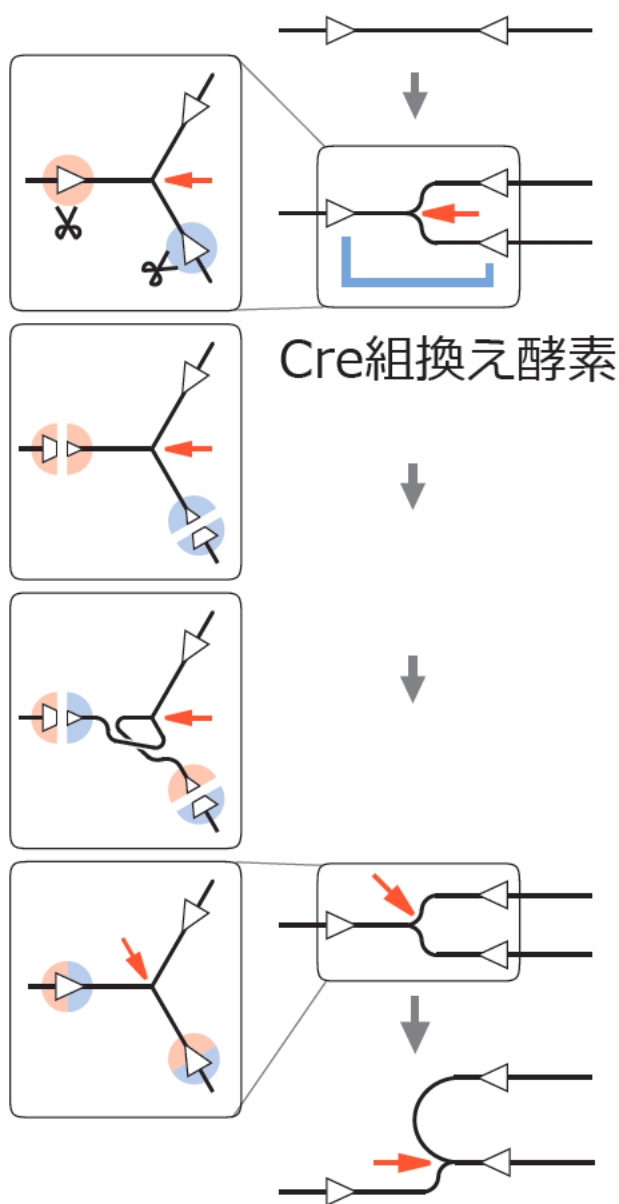
▷ loxP : ATAACTTCGTATA -ATGTATGC- TATACGAAGTTAT

▶ loxm2 : ATAACTTCGTATA -AGAAACCA- TATACGAAGTTAT



- Cre組換え酵素が34bpの配列を特異的に組換える。
- 本系では組換えるペアを限定し増幅を効率良く誘導するため、野生型 (loxP) と変異型 (loxm2) の2種類の配列を利用する。
- 同種配列間 (loxP同士又はloxm2同士) では組換えが起こるが、異種配列間 (loxP-loxm2) では起こらない。

# Cre-loxによる複製フォークの反転



← 複製フォークの進行方向

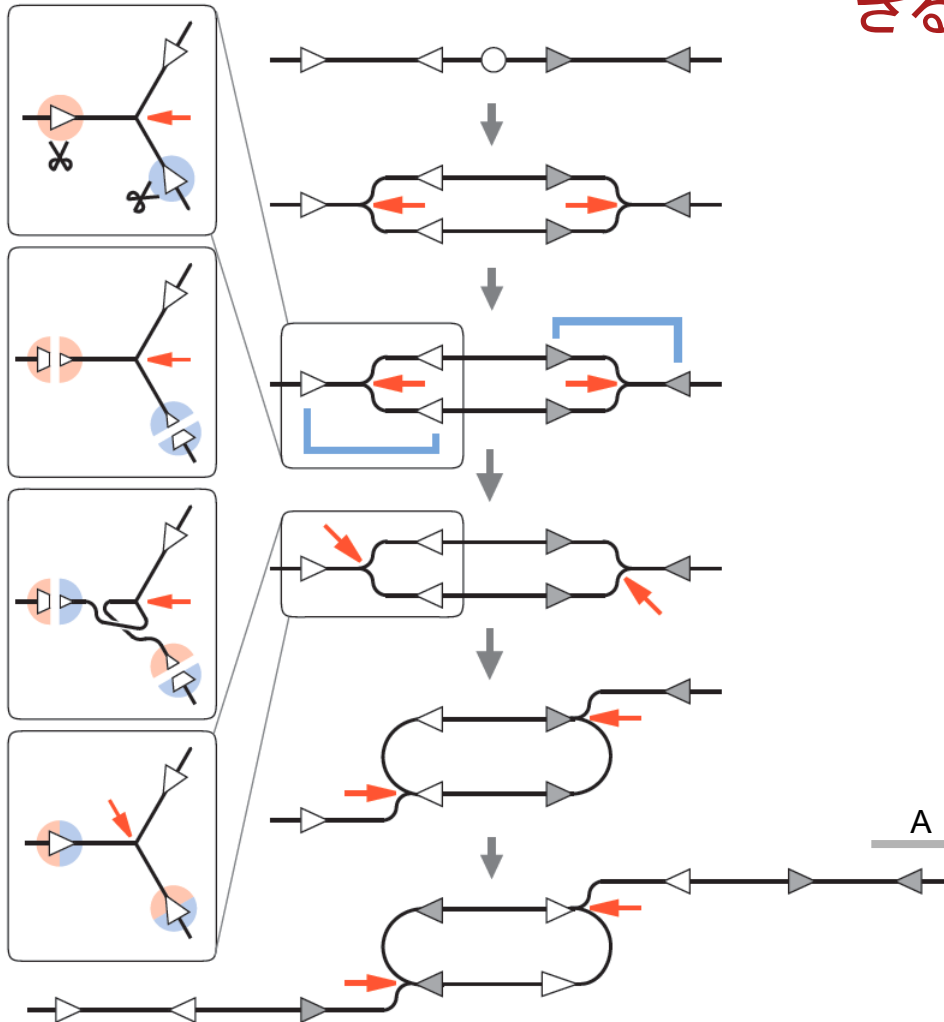
逆向きに並ぶlox配列間を複製フォークが通過する状況を考える。

ここでCre組換え酵素が作用すると組換えは起こるが引き続き同じDNA鎖を鋳型として複製が続く。

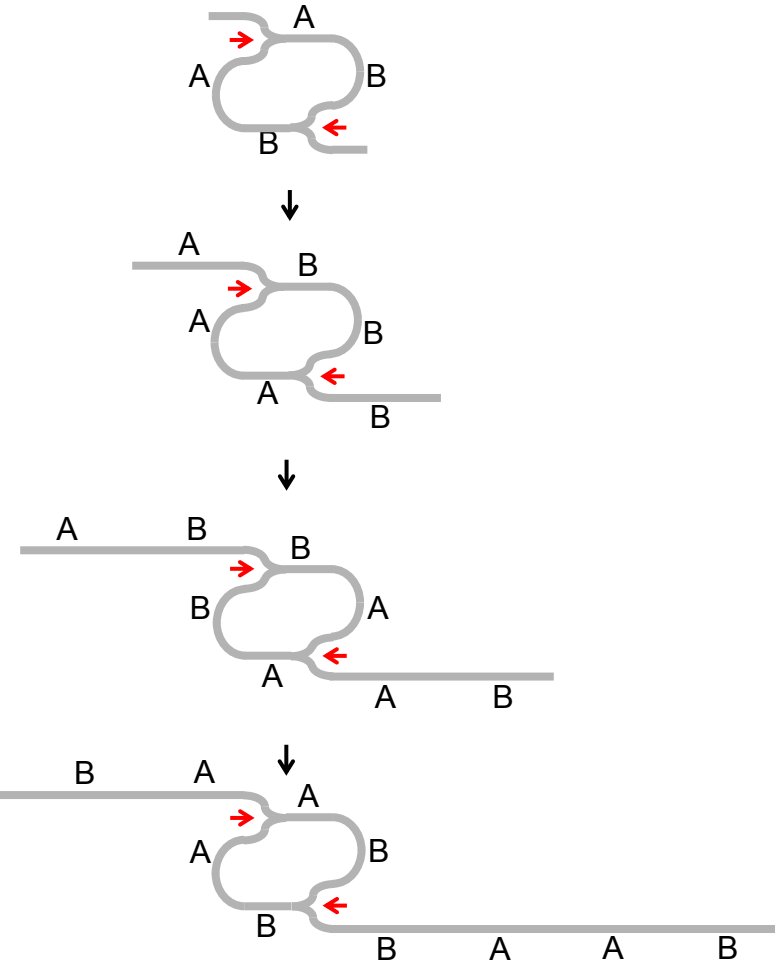
そのため複製フォークは見かけ上反転し複製済みの領域を再度複製する。

# 研究成果1: Cre-loxによるDRCR増幅系の確立

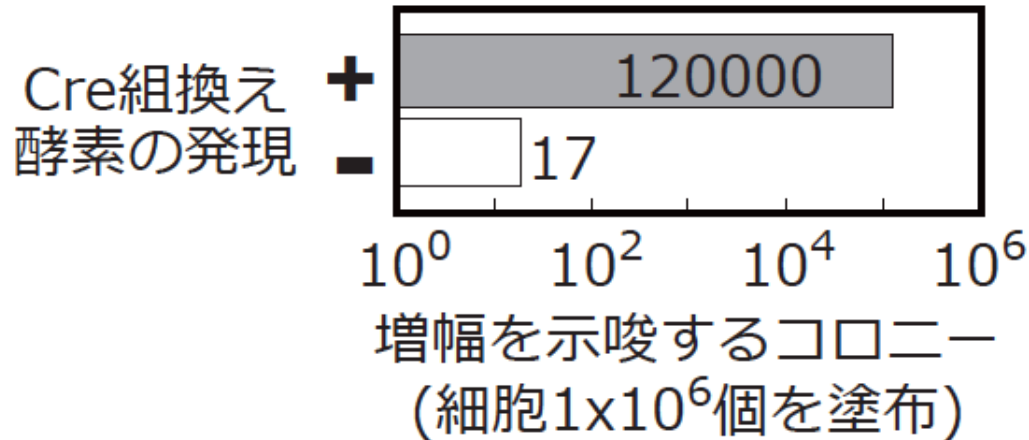
- ← 複製フォークの進行方向
- 複製開始点   ▷ loxP   ▷ loxm2



Cre-lox組換え酵素とその標的配列  
 を利用し、DRCRを効率よく誘導で  
 きる技術を確立した。



## 研究成果2: 出芽酵母Cre-lox-DRCR増幅系



- 出芽酵母系では**12%**の細胞が増幅を示唆するコロニーを形成した。
- Cre組換え酵素の発現により**7000倍**以上の頻度でコロニーを形成した。
- 増幅マーカーを**約100コピー**含む染色体内の増幅領域、又は**約30コピー**を含む染色体外因子(ミニ染色体)を形成した。



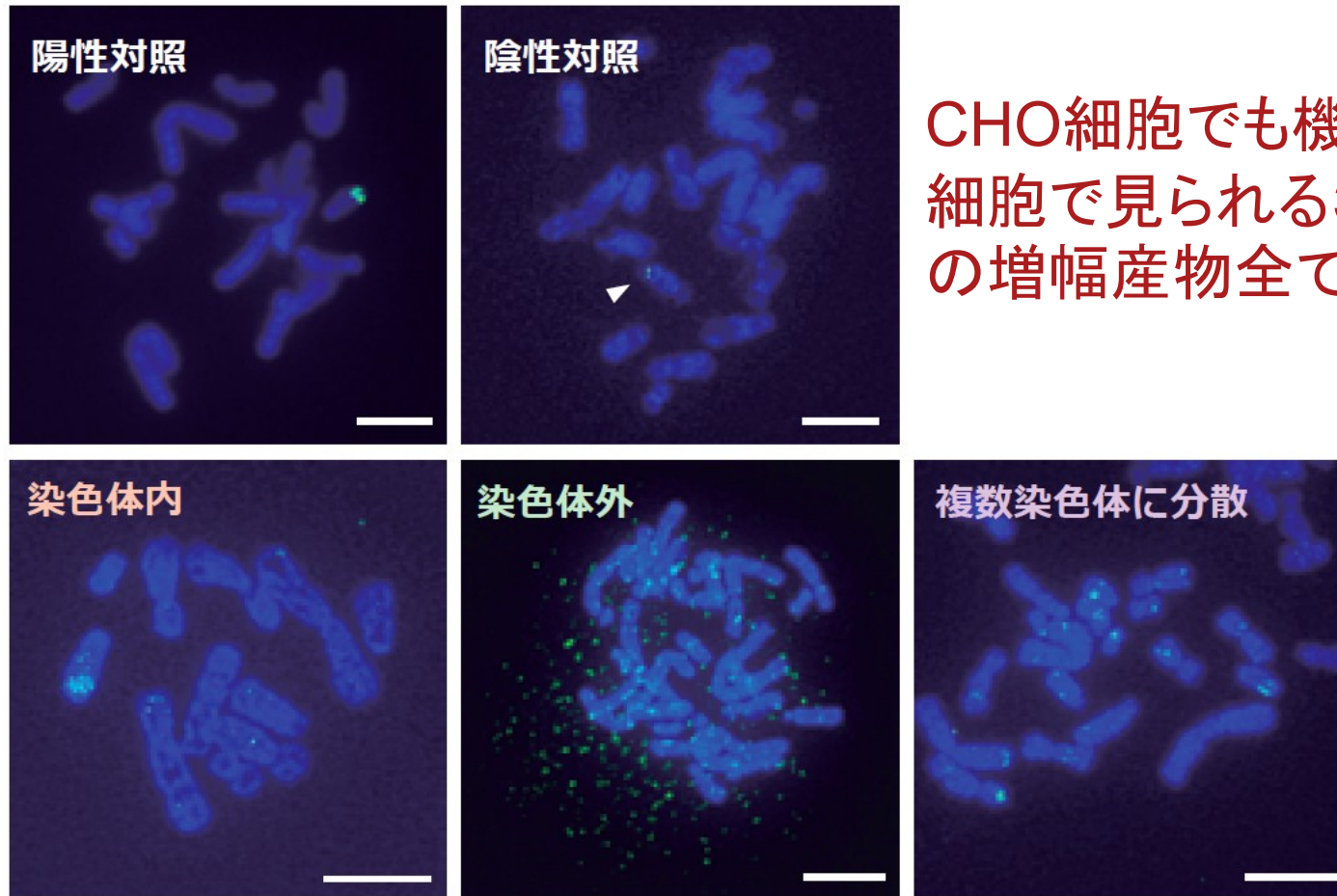
## 研究成果3: バクテリア人工染色体(BAC)の構築

Cre-lox-DRCR増幅系を動物細胞に応用するため、バクテリア人工染色体(BAC)をベクターとすることに成功した。

### 【特長】

- 従来のプラスミドベクターでは10kb程度までDNA断片しか扱えないが、BACでは100~300kbの断片を配置できる。
- 従来は導入遺伝子はゲノムにランダムに挿入され発現抑制を受けることが多かったが、本系は部位特異的組換えを利用し増幅・発現に適した染色体部位に常にBACを挿入できる。
- 大腸菌の相同組換えを利用して数日間で自在に改変できる。
- GFP遺伝子を同時に増幅させ高発現株をセルソーターで回収できる。

## 研究成果4: 動物細胞Cre-lox-DRCR増幅系

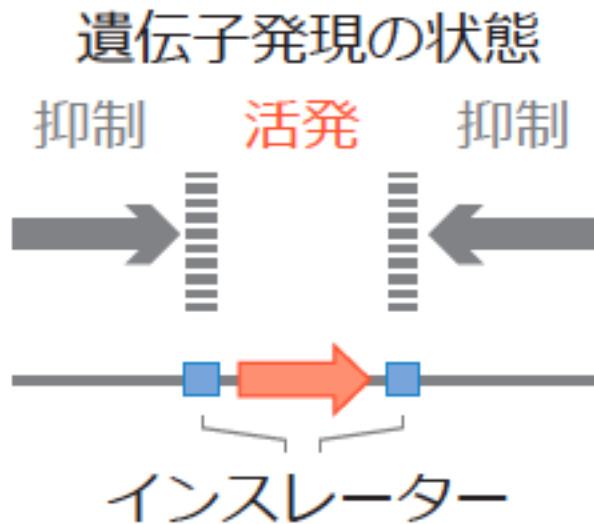


CHO細胞でも機能し、動物細胞で見られる3つのタイプの増幅産物全てを形成した。

分裂期Fluorescence in situ hybridization (FISH)。増幅領域が緑に蛍光標識され、染色体がDAPIで青に染色されている。白線は10 $\mu$ m。陽性対照は従来の一般的な増幅方法によりDHFR遺伝子を約170コピーに増幅させた細胞。DHFR遺伝子を含むプラスミド(4.9kb)をプローブとして用いた。陰性対象は改変BACを染色体に挿入し、増幅誘導を行っていない細胞。

## 研究成果5: タンパク質生産を評価するユニット

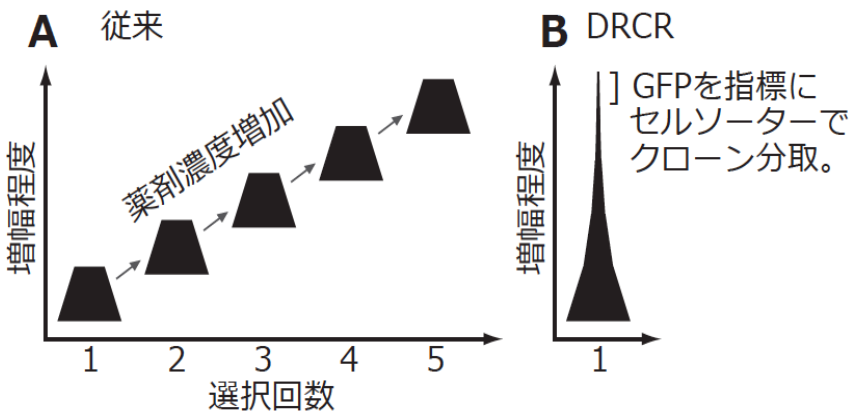
- 高度な繰り返し配列からなる遺伝子増幅領域は遺伝子発現や組換えが抑制される現象、サイレンシングを受けやすい。



### 【評価ユニットの特徴】

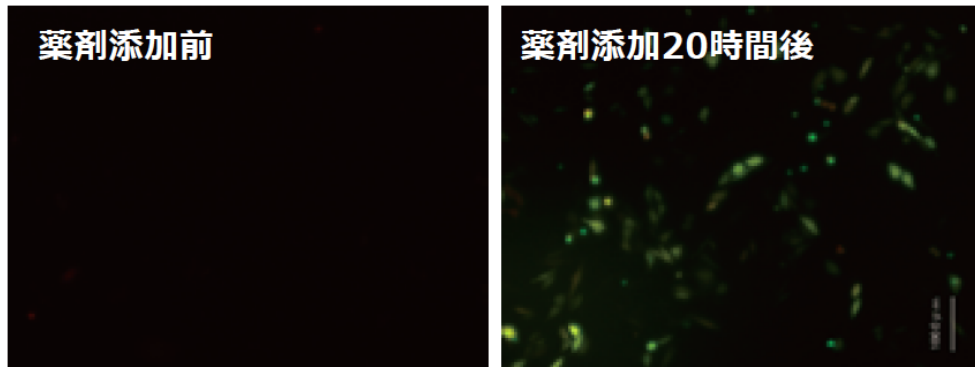
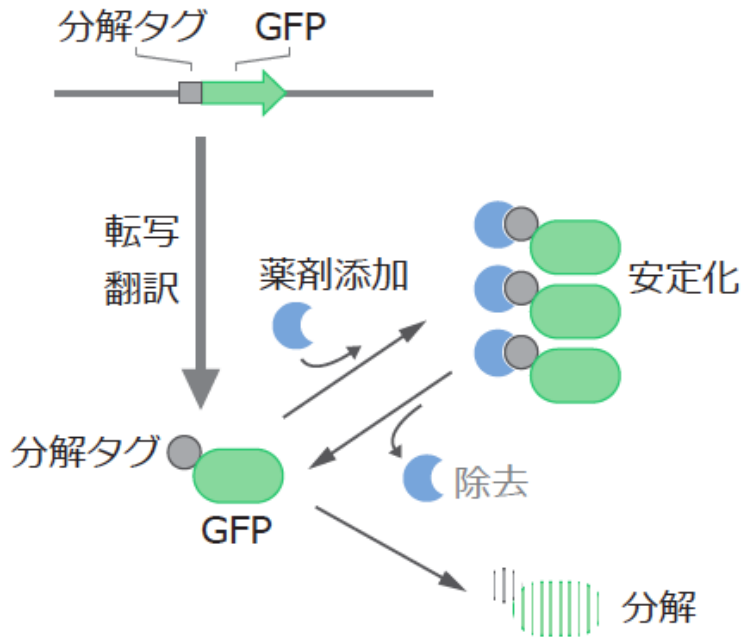
- インスレーター配列 (DNA配列) はこのサイレンシングを遮断する効果をもつ。
- タンパク質医薬として使用されるG-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 遺伝子の両側に、動物細胞での研究実績があるニワトリHS4インスレーターを増幅系に配置し、G-CSF生産性の評価を継続中。

# 研究成果6: GFPによる高発現細胞の回収法



(A)従来の増幅系と(B)DRCR系の比較。黒い図形の横幅は細胞数を表す。

- GFP遺伝子を増幅系に配置すれば、セルソーターを利用して蛍光を強く発する細胞を採取し、目的遺伝子の発現量が高い細胞を収集できる。
- GFPが細胞内に過剰に蓄積して悪影響が出ることをさけるため、タンパク質分解を制御できるタグを付加し、必要時のみ安定化して検出する。



タンパク質分解を制御できるGFP遺伝子。動物細胞に分解タグと融合したGFP遺伝子を導入した。安定化薬剤の添加前には分解タグがユビキチン-プロテアソーム系により分解されGFPの蛍光は検出できないが(左)、安定化薬剤添加後には分解がブロックされ蛍光が検出可能となる(右)。

# 新技術の特徴、従来技術・競合技術との比較1

	新技術 Cre-lox-DRCR系	従来技術 従来型の増幅系	競合技術 遺伝子組換え動植物
増幅頻度	◎ >10% (10 <sup>3</sup> ~10 <sup>5</sup> 倍)	△ 0.01~0.0001%	
増幅速度	◎ 一回の細胞周期で増幅可能であり、セルソーターにより高発現細胞を回収できる	△ 増幅を繰返す必要がある	
確実性	◎ 増幅・発現に適した部位に特異的に挿入された細胞を選ぶことができる	△ 導入遺伝子がランダムにゲノムに挿入され、発現抑制を受けやすい	△ 導入遺伝子がランダムにゲノムに挿入され、発現抑制を受けやすい

# 新技術の特徴、従来技術・競合技術との比較2

	新技術 Cre-lox-DRCR系	従来技術 従来型の増幅系	競合技術 遺伝子組換え動植物
拡張性	◎ BACには100~300kbを配置でき、数日間で自在に改変できる	△ プラスミドに10kb程度の断片しか配置できない	△ 左同様、プラスミドを基にしている
生産コスト	○ 増幅の頻度・速度等が向上している	X 培養に手間がかかり増幅の頻度や速度が不十分	◎ 一度系を確立すると極めて低コスト
継続性	◎ 従来の生産設備や生産ノウハウ・安全性情報を活用できる	◎ 従来の生産設備や生産ノウハウ・安全性情報を活用できる	△ タンパク質精製や安全面に課題がある

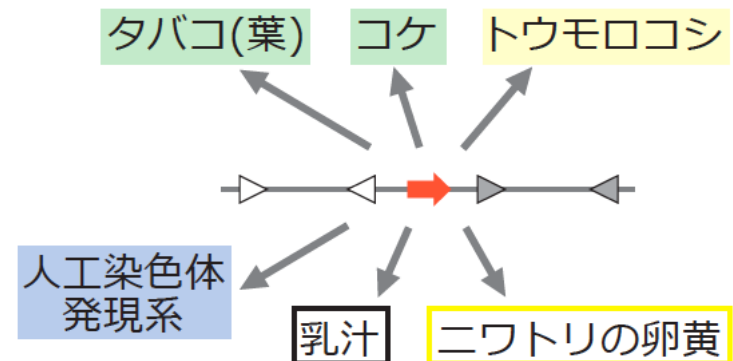
# 想定される用途1

## 1. 高品質タンパク質の迅速な大量調整

- バイオ医薬品、診断薬の生産、研究開発
- 抗体および抗原タンパク質の大量調整
- 創薬研究におけるGPCR等の立体構造の複雑なタンパク質の調整
- 結晶化のためのタンパク質試料の調整

## 2. 他のタンパク質生産系の生産性増強、発現安定化

遺伝子組換え動植物や、人工染色体発現系等、他の生産系にも応用可能

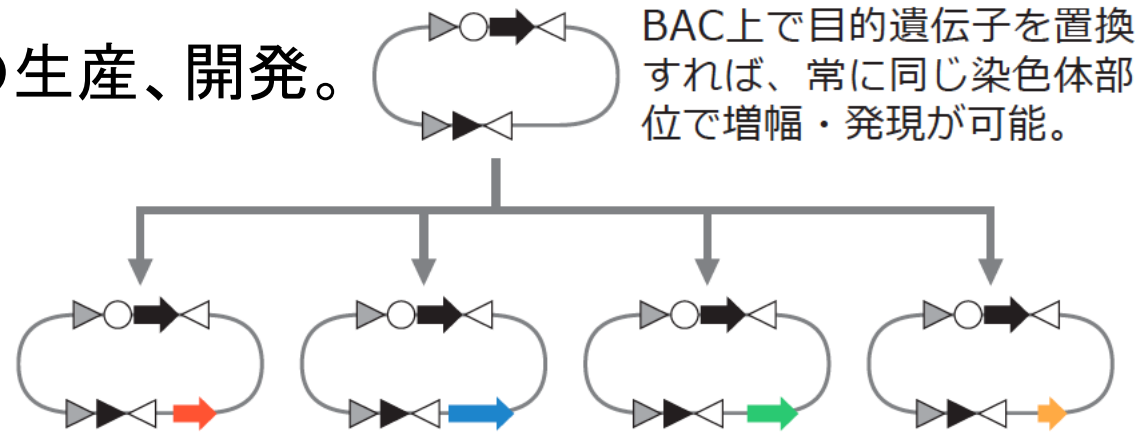




## 想定される用途2

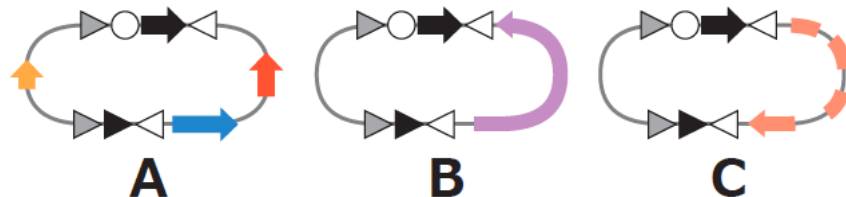
### 3. 多種類のタンパク質のシステムティックな生産。

- プロテインチップの生産、開発。



### 4. 拡張性を生かした多様な方法でのタンパク質生産

- ヘテロダイマー等の複数タンパク質の同時発現(A)。
- 巨大タンパク質の大量調整(B)。
- イントロンを含むゲノム領域からの発現(C)。





# 実用化に向けた課題

## 継続中課題

- ・タンパク質生産性の評価
- ・増幅頻度の検証
- ・高発現株の樹立期間の検証
- ・GFP遺伝子とセルソーターを利用した高発現株の収集方法の確立

## 新規課題

- ・高効率タンパク質生産系の開発

平成23年度A-STEP探索タイプで採択

課題名:「遺伝子増幅現象のボトルネックを克服した高効率タンパク質生産系の開発」

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 遺伝子増幅法
- 出願番号 : WO/2007/060764
- 出願人 : 自然科学研究機構
- 発明者 : 堀内嵩、渡邊孝明

# 想定される技術移転

## 市場

- ・抗体医薬品は、国内だけで年20%以上の成長を続けている(2010年度)。
- ・哺乳類細胞の高発現システムでは、Lonza社のGS (Glutamine synthetase)システムが、高い生産性とスクリーニング効率がよいことから市場を独占している。しかし、高額な契約資金が必要な為、国産の高発現システムの開発が望まれている。

## 企業への期待

### 1. 診断薬企業(開発、生産)

自己免疫疾患診断薬等の抗原タンパク質の大量生産に関する共同研究・技術移転

### 2. 創薬企業(開発)

新規疾病治療薬の開発において、短期間で多種類のタンパク質を生産し候補タンパク質をスクリーニングする技術の共同研究・技術移転

### 3. 蛋白質生産受託企業(生産)

タンパク質の高い生産性技術の技術移転

## お問い合わせ先

自然科学研究機構 基礎生物学研究所  
多様性生物学研究室(渡邊) 助教  
渡邊 孝明

TEL & FAX: 0564-55-7691

E-mail: [watatka@nibb.ac.jp](mailto:watatka@nibb.ac.jp)

(独)科学技術振興機構 産学連携展開部  
事業推進(募集・探索)担当 技術移転プランナー  
植松 宏彰

TEL & FAX: 03-5214-8994

E-mail: [h2uemats@jst.go.jp](mailto:h2uemats@jst.go.jp)