



Improved transgene integration into the CHO cell genome using the Cre-loxP system

Cre-loxPシステムを用いたCHO細胞ゲノムへの改良された遺伝子導入

(JBB, Vol. 120, No. 1, 99–106, 2015)

稲生 崇規・河邊 佳典・山城 拓郎・亀山雄二郎
汪 雪・井藤 彰・上平 正道*

抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品は、CHO細胞などを宿主とした遺伝子組換え動物細胞培養により生産されており、生産細胞の構築に多大な労力と時間がかけられている。この際、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する必要があるが、これまでに繁用されているDHFR-MTX, GS-MSX法といった従来法では、染色体への導入部位も不特定なものであり、確率論的に起こる現象に期待するため、安定かつ高発現な細胞株を確実に取得するための方法論の開発が求められている。筆者らは、動物細胞での生産細胞構築のためにゲノム染色体への部位特異的遺伝子導入法として、配列特異的な組換え酵素（リコンビナーゼ）が利用できないかと考え2006年頃より検討を行ってきた。それまでも動物細胞の染色体工学において、Cre-loxPやflp-FRTといった組換え酵素システムは、細胞内因子の関与なしにそれぞれ対応するターゲットサイト同士の削除、組込、転置といった組換え反応を効率的に触媒することから、遺伝子機能解析の基礎分野でしばしば用いられていたが、変異ターゲットサイトの開発により反応性制御がある程度可能となり利用範囲が広がった。特に、Cre-loxPシステムでは特徴ある多くの変異loxPが報告されており、我々は変異loxPの特徴を組み合わせることによって逐次遺伝子組込みシステム（accumulative

gene integration system; AGIS）を開発した¹⁻³⁾（図1）。

AGISでは、34 bpからなるloxPのアーム変異とスペーサー変異の両者の特性を組み合わせることによって、Cre依存的に独立して不可逆的な挿入反応がおこることを利用しており、2回の組込反応の後に組換え可能なターゲットサイトが初期状態に戻るように設計することで遺伝子組込み反応を原理的に無限に繰り返すことを可能にした。AGISによる目的遺伝子のゲノムへの組込み効率は、使用する変異loxPに大きく依存していた。そこで、AGISへの適用に適した組込効率の高い変異loxPの探索を行った。スペーサー領域に野生型配列を含む13種類、アーム領域に左右2種類ずつの変異配列を組み合わせ、計52種類の変異loxPの組込み反応効率を、*in vitro*での組込み効率評価系を構築して検証した。その結果、AGISで使用していた変異loxPよりも高い組込み効率を示すものを、新規の変異loxP配列を含めて複数選抜することができた。ここで選抜した変異loxPをAGISに適用し、CHO細胞ゲノムへの遺伝子組込み反応に使用したところ、これまでにAGISで用いていた変異loxPよりも約3倍高い組込み効率を示すことがわかった。

AGISでは、Cre依存的に染色体に組み込まれたターゲットloxP部位に複数の目的遺伝子あるいは複数回目的遺伝子をタンデムに導入することができる。動物細胞ゲノムやベクター上で目的遺伝子の部位特異的導入、ホットスポットターゲティング、大きな遺伝子の構築、遺伝子増幅システムとして用いることができる。また、このシステムがウイルスベクターによる標的染色体部位への遺伝子導入にも適用可能であることを報告している^{4,5)}。この方法が、物質生産を目的とした組換え動物細胞作製において有用な方法となることを期待したい。

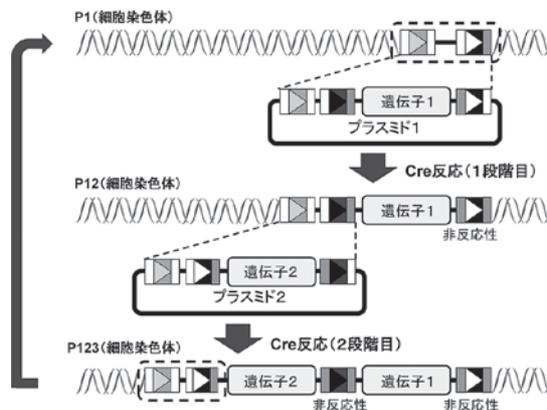


図1. Cre-loxPを用いる逐次遺伝子組込みシステム（AGIS）

- 1) Kameyama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1106 (2010).
- 2) Kawabe, Y. *et al.*: *Cytotechnology*, **64**, 267 (2012).
- 3) Obayashi, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 381 (2012).
- 4) Huang, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **107**, 717 (2010).
- 5) Kawabe, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 1600 (2016).

* 著者紹介 九州大学大学院工学研究院化学工学部門（教授） E-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp