

組換え蛋白質生産を革新する IR/MAR 遺伝子増幅法

育成研究：JSTイノベーションプラザ広島 平成21年度採択課題
「IR/MAR 遺伝子増幅法を蛋白質生産の基幹技術へと育成するための研究」

代表研究者：広島大学大学院・生物圏科学研究科・
生物機能開発学専攻 教授 清水典明



■ 研究概要

我々が独自に見いだした全く新しい IR/MAR 遺伝子増幅法を、蛋白質生産の汎用技術として育成するために、巨大な市場を持つヒト化組換え抗体の生産に適用して検討した。その結果、極めて高い生産性を示す安定な細胞クローンが効率よく得られ、世界で高い競争力を持つ方法であることが示された。

■ 研究内容、研究成果

特定の遺伝子の数が細胞内で増加し、その蛋白質産物の量が増加する現象は、がん化の過程で頻繁に見られる。代表研究者は長年、このような遺伝子増幅の研究を行う過程で、全く独自に、望みの遺伝子を細胞内で高度に遺伝子増幅させる実験系を見いだした。この全く新しい方法は、哺乳動物複製開始領域（IR）と核マトリックス結合領域（MAR）を持つプラスミドを使用することから、IR/MAR(アイアール・マー) 遺伝子増幅法と呼ぶ。一方、DHFR 遺伝子を持つプラスミドを MTx 選別で増幅させる方法は、従来から蛋白質生産に汎用されてきた。この DHFR/MTx 法に比べて我々の IR/MAR 法は、遺伝子増幅の効率が極めて高く、有害な MTx を使わなくとも自発的に1段階で遺伝子増幅する。本育成研究では、この IR/MAR 法を、組換え蛋白質医薬品として巨大な市場規模を持つ抗体蛋白質の生産に適用した。その結果、蛋白質生産に汎用されている CHO-DG44 細胞で、抗体遺伝子を持つプラスミドは IR/MAR 法により効率よく増幅され(図1)、IR/MAR を持たない通常の発現ベクターに比べて飛躍的に高レベルの抗体蛋白質を生産する細胞が得られ、さらに、高発現のクローン化細胞が飛躍的に高い頻度で得られるようになった(図2)。このようなクローン化細胞は、長期間の培養の間、生産性と構造の双方に関して安定であった。このような結果は、様々なベクター構造について極めて安定して再現された。さらに我々は、従来から汎用された DHFR/MTx 法と併用することにより、効率的により高生産でより安定なクローンが得られることを見いだした(図3)。IR/MAR 法により培地中に分泌された抗体蛋白質は、電気泳動的に均一であり、反応性に関しても問題は見られなかった。得られた高生産クローンを無血清培地中で浮遊高密度培養を行って検討したところ、最高 45 pg/cell/day の比生産速度を持つことが示された。これは、抗体蛋白質に関して世界最高レベルである。

■ 今後の展開、将来の展望

本育成研究により、品質に問題のない抗体蛋白質を極めて高い比生産速度で発現する安定性の高いクローンを効率よく取得できることが示された。すなわち高い能力を持つ細胞を得ることにに関して、世界で高い競争力を持つ。一方、培地中の抗体蛋白質濃度は、細胞の能力だけでなく培養法によって大きく左右される。そのため今後、最適な培養法と組み合わせることにより、培地中の産物濃度がどこまで高まるかを検討する必要がある。さらに、抗体医薬を含めて多種多様な蛋白質製品について具体的に適用して、実績を積み重ねるとともに、汎用技術として使用されるように宣伝等を行う必要がある。そこで、培養技術に長けた企業、適用可能な蛋白質製品の候補を持つ企業、等々、との共同研究やライセンスを希望する。

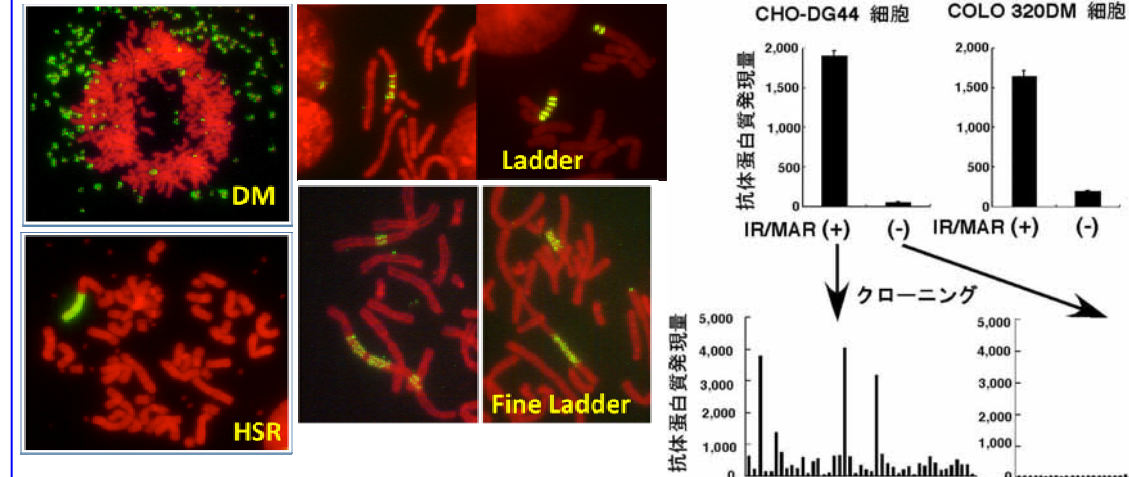


図1. IR/MAR プラスミドは、哺乳動物細胞内で自発的に遺伝子増幅する。染色体(赤色)中で、プラスミド配列(緑色)を検出した。HSRを形成し、CHO-DG44 細胞中では ladder や Fine Ladder 構造を形成する。

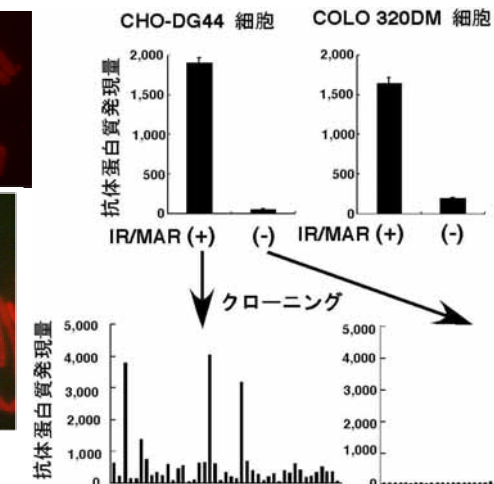


図2. ハムスターCHO-DG44 細胞、あるいはヒト COLO 320DM 細胞で、IR/MAR 遺伝子増幅法を用いることにより、飛躍的に抗体蛋白質発現量が上昇した。その結果、高発現の細胞クローンを高頻度で取得することが可能となった。

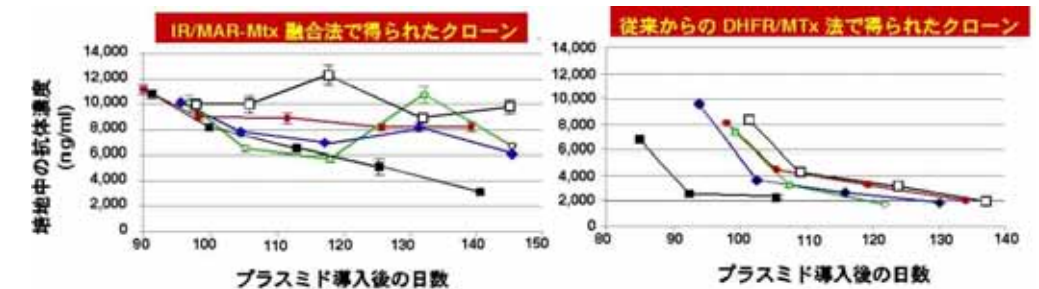


図3. IR/MAR 遺伝子増幅法を、従来から汎用されてきた DHFR/MTx 法と融合させることで(左側)、DHFR/MTx 法単独ではクローンの安定性が悪いという大きな欠点(右)が解消し、安定で高発現のクローンが効率よく得られるようになった。

無血清培地中での、浮遊高密度培養 **45 pg/cell/day**

図4. 工業的蛋白質生産に汎用されている CHO-DG44 細胞を用い、抗体蛋白質の比生産速度に関して、世界最高レベルを達成した。

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
〔広島大学大学院 生物圏科学研究科 生物機能開発学専攻 教授 清水典明〕
- ◆ 研究者
清水典明(広島大学)、荒木義雄(広島大学)、
野口千笑(広島大学)、濱藤徹郎((株)トランスジェニック)
- ◆ 共同研究機関
(株)トランスジェニック

■ 研究期間

平成21年4月 ~ 平成24年3月