

E320

逐次組込みシステムに適した変異 *loxP* 配列のスクリーニング

(九大院工・化工) ○ (学) 亀山 雄二郎、(学) 渡邊 涼子、(学) 槇坪 寛勝、
(正) 河邊 佳典、(正) 井藤 彰、(正) 上平 正道*

1. 緒言

遺伝子組換え動物細胞を用いてバイオ医薬品などの有用物質を大量に生産する際、生産性の高い細胞株を樹立するために、選択マーカーである薬剤耐性遺伝子や核酸合成遺伝子を利用して、目的遺伝子のコピー数を染色体上で増幅させる方法が用いられている。しかし、この方法の良否は細胞株に大きく依存しており、一般的に効率が低く、確実性に欠け、選抜に長期間を要することなどが問題となっている。そこで、我々は組換え酵素 Cre と複数の変異 *loxP* 配列を用いることで、逐次的かつ配列特異的に目的遺伝子を動物細胞染色体上に組込むことが可能な逐次組込みシステムの開発を行ってきた (1)。本研究では、高効率な逐次遺伝子導入を達成するために、反応効率の高い変異 *loxP* 配列のスクリーニングを行った。

2. 実験方法

組換え反応検証用プラスミドとして、CMV プロモーター配列の下流に開始コドン配列 (ATG) と *loxP* 配列をインフレームとなるように設計したアクセプタープラスミド (AP) と、*loxP* 配列の下流に ATG を欠損した *EGFP* を有するドナープラスミド (DP) を作製した (図 1)。組換え酵素 Cre を安定して発現する細胞株 (CHO/Cre) を樹立した後、AP および DP を一過性で遺伝子導入し、48 時間後に FACS を用いて蛍光強度を測定することで反応効率を決定した。

3. 実験結果および考察

変異 *loxP* 配列のスクリーニングのために、AP および DP の間で Cre 組込み反応が起こり、*EGFP* 遺伝子がプロモーター配列下流に配列特異的に組込まれた場合にのみ、緑色蛍光が確認できるシステムを構築した (図 1)。*loxP* 配列は、両端に位置するアーム領域とその間に位置するスペーサー領域と呼ばれる配列から構成されているが、逐次組込みシステムの反応効率はスペーサー領域の配列に依存していることがこれまでに得られた結果によって示唆されている。そこで、これまでの逐次組込みシステムで使用した 3 種類のスペーサー配列 (SP.WT、SP.1、SP.2) と既に報告されている 7 種類のスペーサー配列 (SP.3~SP.9) (2) の Cre による組換え反応効率を検証し、逐次組込みシステムに適したスペーサー配列の選抜を試みた。

各スペーサーを有する AP と DP をそれぞれ作製した後、同種のスペーサーを有する AP と DP の組み合わせで CHO/Cre 細胞に遺伝子導入することで反応さ

せた。FACS により反応効率を測定したところ、SP.3、SP.5 および SP.7 は、これまで逐次組込みシステムにおいて用いてきた SP.2 より高い反応効率を示しており、Cre による組込み反応効率はスペーサー配列に依存していることが確認できた (図 2)。

また、Cre-*loxP* の組換え反応により目的遺伝子を逐次的にゲノム DNA へ組込むためには、用いるスペーサー配列が互いに反応しないことが必要とされる。そこで、SP.3、SP.5、SP.7 およびこれまで用いてきたスペーサー配列 SP.WT、SP.1 の中で異種のスペーサー配列間で反応する組み合わせがあるかを、異種のスペーサーを有する AP と DP の組み合わせで反応させることで検証した。その結果、SP.WT と SP.3 の間では Cre による組換え反応が起こることが確認されたが、その他の異種スペーサーの組み合わせでは組換え反応は起きなかった。これらの結果から、選抜されたスペーサー配列は逐次組込みシステムに適したものとして利用可能であると考えられる。

(1) Kameyama *et al.* (2010) *Biotechnol. Bioeng.* in press

(2) Missirlis *et al.* (2006) *BMC Genomics* 7, 73-85

*FAX: 092-802-2793; phone: 092-802-2743

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

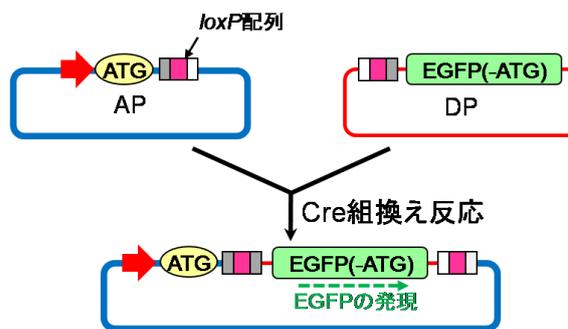


図 1. 組換え反応評価システム

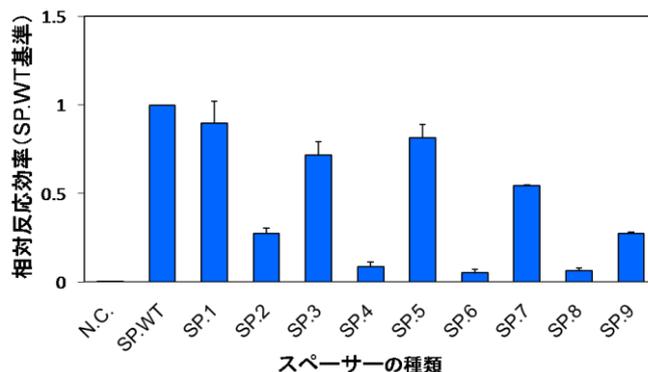


図 2. 各スペーサーにおける組換え反応効率