OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	遺伝子増幅現象を利用した効率的物質生産に関する研究 : CHO細胞における遺伝子増幅を用いたhGM-CSF生産の定量的解析とその応用
Author(s)	吉川, 智啓
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3183665
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	吉川智啓（よしかわともひろ）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 15774 号
学位授与年月日	平成12年11月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	遺伝子増幅現象を利用した効率的物質生産に関する研究 －CHO細胞における遺伝子増幅を用いたhGM-CSF生産の定量的解析と応用－
論文審査委員	（主査） 教授 菅 健一 （副査） 教授 室岡 義勝　教授 吉田 敏臣　教授 卜部 格 教授 塩谷 捨明　教授 福井 希一　教授 原島 俊 教授 小林 昭雄　教授 関 達治　教授 二井 將光 教授 金谷 茂則

論文内容の要旨

本論文は、動物細胞を用いた物質生産において、根幹にあると考えられる生産に適した細胞株の構築法開発に焦点を絞り、遺伝子増幅現象を定量的に取り扱い、効率的な遺伝子増幅細胞構築法及び選択法について研究を行っている。論文は序論、第1章、第2章、第3章、第4章及び総括から構成されている。

序論では本研究の背景をなす知見を概説し、本論文の目的と意義について述べている。

第1章では、増幅遺伝子の染色体中における位置をfluorescence *in situ* hybridization（FISH）法によって特定し、増幅遺伝子がテロメア近傍に存在する細胞（telomere type）と、テロメア以外の染色体領域に有する細胞（other type）及び、FISHのシグナルが観察されなかったもの（no signal）の3つのグループに分類し、それぞれの細胞群について目的物質の比生産速度、その安定性について検討し、増幅遺伝子の染色体中における位置が遺伝子増幅細胞の諸性質に影響を与えていることを推測している。

第2章では、第1章で得られた細胞群の中から37クローンを取得し、それぞれのクローンについて比増殖速度、目的タンパク質生産速度を解析しtelomere typeのクローン細胞は、other typeのクローン細胞に比べ高い比速度を有し、MTX非添加条件における長期培養においても、高い生産性を維持していることを示している。

第3章では、Flow－cytometry（FCM）を用いて、高生産細胞であるtelomere typeの細胞の選択法について検討し、ヘテロなMXT耐性細胞群から高生産能を有する細胞であるtelomere typeを多く含む細胞集団を取得できることを示している。

第4章では、染色体画像解析システム（CHIASⅢ）を用いて、CHO DG44株の標準的な核型を作成し、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定した結果、増幅遺伝子が特定の染色体のテロメア近傍に組み込まれていることを明らかにしている。

総括では、本研究により得られた成果を総括し、将来の展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

遺伝子増幅現象を利用した動物細胞による組換えタンパク質生産の効率化に関する研究は、他の方法による生産性

の向上への取り組みに比べ非常に遅れている。本研究は、動物細胞を用いた物質生産において、根幹にあると考えられる生産に適した細胞株の構築法の開発に焦点を絞り、遺伝子増幅現象を定量的に取り扱い、その知見から効率的な遺伝子増幅細胞の構築法及びスクリーニング法について研究を行い、さらに、遺伝子増幅が高頻度に生じる理由についても考察したもので、得られた主な成果は以下の通りである。

(1) 染色体中における増幅遺伝子の位置を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法によって特定し、増幅遺伝子の染色体中における位置が、得られる細胞の性質に影響を与えていることを明らかにしている。

(2) 細胞群の中から37種のクローンを取得し、比増殖速度、目的タンパク質生産速度を解析した結果、telomere type のクローン細胞は、other type のクローン細胞に比べ高い比速度を有しており、MTX 非添加条件における長期培養においても、高い生産性を維持していることを明らかにしている。

(3) Flow-cytometry (FCM) を用いて、簡便かつ、効率的な高生産細胞 (telomere type) の選択法について検討し、F－MTX 蛍光強度を指標とし、telomere type 細胞を多く含む細胞集団が取得可能であることを示している。

(4) CHIASⅢを用いて実験を行い、CHO DG44 株の標準的な核型を作成した結果、CHO DG44 株は、20本の染色体を有していることを明らかにし、標準的な核型を用いて、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定した結果、増幅遺伝子が特定の染色体のテロメア近傍に組み込まれていることを確認している。またその位置に増幅遺伝子が組み込まれた細胞は高生産株であり、また MTX 非存在下においても安定に組換えタンパク質を生産する telomere type の細胞であることを明らかとしている。

以上のように、本論文は遺伝子増幅現象を利用した組換えタンパク質生産に適した遺伝子増幅細胞の効率的構築法及び、選択法に関して新しい知見を含んでおり、動物細胞工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は、博士論文として価値あるものと認める。