



Title	Analysis and application of Dhfr amplification in Chinese hamster ovary cell
Author(s)	朴, 俊映
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57474
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

抗体医薬を始めとするバイオ医薬品の生産系にはChinese hamster ovary (CHO) 細胞に代表される本来の発現系に近い動物細胞を宿主として用いる必要がある。しかしながら、動物細胞を用いた場合、微生物に比べ、増殖速度が低い、培地が高価であるといった問題点が存在する。一般に高発現CHO細胞株を構築する際には遺伝子増幅が用いられているが、遺伝子増幅領域の染色体配列や増幅のメカニズムについては未だ十分には明らかになっていない。本研究では、CHO細胞における遺伝子増幅領域の解明と応用を目的として、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (*Dhfr*) 増幅CHO細胞株における遺伝子増幅領域の解析ならびに、その構造が遺伝子増幅に与える影響を検討した。

第2章では、遺伝子増幅領域の配列解析を行うため、増幅領域の取得を目的として、マウス*Dhfr*およびヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (*hGM-CSF*) 遺伝子が増幅されたCHO DR1000L-4N株からCHO細胞のゲノムサイズの約5倍長をカバーするバクテリア人工染色体 (BAC) ライブラリーを構築した。

第3章では、構築したBACライブラリーから遺伝子増幅領域の配列を取得した。BACライブラリーから選択された増幅領域を保持する15個のBACクローンは全て同じ増幅領域を保持しており、解析された構造がCHO細胞における*Dhfr*遺伝子増幅の単位複製配列と考えられた。また、得られたCHO由来配列は、宿主細胞であるCHO DG44細胞においても低レベルの増幅が生じていた領域であった。

第4章では、全配列情報を決定したBACクローンの配列情報を基にして、*hGM-CSF*を緑色蛍光蛋白質遺伝子 (*GFP*) に置き換えて遺伝子増幅構造を含むベクターを構築した。CHO染色体より得られた遺伝子増幅構造に基づいて、元々の遺伝子導入ベクター、ベクター由来遺伝子増幅領域を全て含むベクター、およびその逆位反復構造の一部を削除したベクターの3種類を構築し、遺伝子増幅を用いて生産株構築をおこなった。その結果、ベクター由来遺伝子増幅領域を含むベクターを導入した遺伝子増幅細胞株において、MTXへの馴化期間の短縮が見られた。また、GFP陽性クローンを評価した結果、ベクター由来遺伝子増幅領域を含むベクターが導入された細胞株が他の細胞株に比べGFP陽性クローンの取得割合が増加し、生産株の迅速構築が可能となった。以上の結果は、CHO細胞における増幅領域構造の解明と利用につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

抗体医薬を始めとするバイオ医薬品の生産系にはChinese hamster ovary (CHO) 細胞に代表される本来の発現系に近い動物細胞を宿主として用いる必要がある。しかしながら、動物細胞を用いた場合、微生物に比べ、増殖速度が低い、培地が高価であるといった問題点が存在する。一般に高発現CHO細胞株を構築する際には遺伝子増幅が用いられているが、遺伝子増幅領域の染色体配列や増幅のメカニズムについては未だ十分には明らかになっていない。本論文では、CHO細胞における遺伝子増幅領域の解明と応用を目的として、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (*Dhfr*) 増幅CHO細胞株における遺伝子増幅領域の解析ならびに、その構造が遺伝子増幅に与える影響が検討されている。

第2章では、遺伝子増幅領域の配列解析を行うため、増幅領域の取得を目的として、マウス*Dhfr*およびヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (*hGM-CSF*) 遺伝子が増幅されたCHO DR1000L-4N株からCHO細胞のゲノムサイズの約5倍長をカバーするバクテリア人工染色体 (BAC) ライブラリーを構築している。

第3章では、構築したBACライブラリーから遺伝子増幅領域の配列を取得している。BACライブラリーから選択された増幅領域を保持する15個のBACクローンは全て同じ増幅領域を保持しており、解析された構造がCHO細胞における*Dhfr*

【55】

氏名	朴 俊 映
博士の専攻分野の名称	博士 (工学)
学位記番号	第 23773 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Analysis and application of Dhfr amplification in Chinese hamster ovary cell (Chinese hamster ovary細胞におけるDhfr遺伝子増幅の解明と応用)
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 紀ノ岡正博 教授 渡邊 肇 准教授 大政 健史

遺伝子増幅の単位複製配列と推定されている。また、得られたCHO由来配列は、宿主細胞であるCHO DG44細胞においても低レベルの増幅が生じていた領域であるとの結果が得られている。

第4章では、全配列情報を決定したBACクローンの配列情報を基にして、hGM-CSFを緑色蛍光蛋白質遺伝子(GFP)に置き換えて遺伝子増幅構造を含むベクターが構築されている。CHO染色体より得られた遺伝子増幅構造に基づいて、元々の遺伝子導入ベクター、ベクター由来遺伝子増幅領域を全て含むベクター、およびその逆位反復構造の一部を削除したベクターの3種類を構築し、遺伝子増幅を用いて生産株構築をおこなっている。その結果、ベクター由来遺伝子増幅領域を含むベクターを導入した遺伝子増幅細胞株において、MTXへの馴化期間の短縮が見られている。また、GFP陽性クローンを評価した結果、ベクター由来遺伝子増幅領域を含むベクターが導入された細胞株が他の細胞株に比べGFP陽性クローンの取得割合が増加し、生産株の迅速構築が可能となっている。

以上のように、本論文はCHO細胞における増幅領域構造の解明と利用に生物化学工学的および細胞工学的観点から詳細に検討し、多くの知見を得るとともに、今後の遺伝子組換えタンパク質医薬品の開発に有用な基礎的資料を与えており、その成果は生命先端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。