

# CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞の BAC ライブラリー構築とその活用

大政 健史

生体外における動物細胞培養は1907年に実施されたHarrisonによる先駆的な研究から始まり、近年では組換えタンパク質医薬品の生産手段および細胞自身を用いた治療や評価の用途として生物工学の分野でも多用されている。さて、バイオによって生産されている医薬品としては大きな売上げを達成しているタンパク質医薬品生産であるが、実際に生産に用いられている宿主細胞はいったい何であろうか。2006年にアメリカとEUにおいて実際に上市されているバイオ医薬品107品目(抗体医薬29品目を除く)のうち、品目ベースで大腸菌(*Escherichia coli*)が42%、Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞が29%、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)が21%、すなわちこの3つの宿主細胞で実に90%以上のバイオ医薬品が生産されている。また、抗体医薬品に関してもその60%近くがCHO細胞によって生産されており、工業微生物になぞらえると、CHO細胞はまさに「工業動物細胞」と表現されるのにふさわしい利用がされている。

CHO細胞がタンパク質医薬品生産に多用されている理由としては(1)GMP(Good Manufacturing Practice)での生産実績があり、実生産にむけての問題点が明確である、(2)無血清培地に馴化(浮遊培養)が容易であり、産業用培地が発達している、(3)遺伝子増幅を始めとする組換え細胞構築のための手順が明確である、(4)高密度流加培養や灌流培養のような大規模実生産培養の実績とノウハウがあるなどが考えられる。CHO細胞を用いた抗体生産はほぼその生産に関するプラットフォームが構築され、細胞株構築から分離精製、製剤化までの一連の流れが構築されている<sup>2)</sup>。現在では、最大濃度10 g/lの流加培養<sup>3)</sup>が実現可能となり、培養槽の大きさが20,000 l規模での実生産プラントも世界では稼働している。

このように産業規模ではCHO細胞を用いた組換えタンパク質生産が当たり前のように行われているにも関わらず、CHO細胞自体に関しては、これまで十分な解明がなされているとは言えない。これは、基礎科学では実験動物としてのChinese hamsterが利用されなくなっているため、モデル生物として取り上げられることがなく、また、そのゲノムがヒトやマウスに匹敵するサイズであ

り、工業微生物と比較して巨大で、解析に多額の費用と時間が伴うためと考えられる。

近年、ヒトやマウスのゲノム解析プロジェクトが完了し、巨大なゲノムを取り扱う技術が他の生物にも応用されるようになってきた。それと共に、CHO細胞においても、ゲノム情報の解明やプロテオーム、メタボローム解析が徐々に行われるようになってきた。たとえば、ミネソタ大学のHuらのグループは、シンガポールA STAR instituteと共にCHO細胞株からのcDNAライブラリー(EST)の作製を世界で初めて試み、得られたESTに基づいてcDNAマイクロアレイを構築し、さまざまな培養条件や高生産株における発現遺伝子や発現量の違いについて解析し、高生産培養実現のメカニズムの解明を図ろうとしている<sup>4)</sup>。近年、我々のグループもCHO細胞のゲノムを解明してCHO細胞に関する基盤情報の整備を図っている。一般にCHO細胞において高発現細胞株を構築する際には遺伝子増幅現象を利用している。遺伝子増幅とは、ある特定の遺伝子増幅を引き起こす増幅遺伝子と目的タンパク質の遺伝子を同時に細胞に導入し、増幅遺伝子に対する阻害剤を含む培地で選択を行うことにより、導入した目的タンパク質の遺伝子共々、染色体の一部を巻き込みながら、目的タンパク質遺伝子が多コピー組み込まれた細胞を構築する手法である(図1)。構築された細胞は生産性や増殖性がさまざまに変化しており、その中から目的のタンパク質生産に適した細胞が得

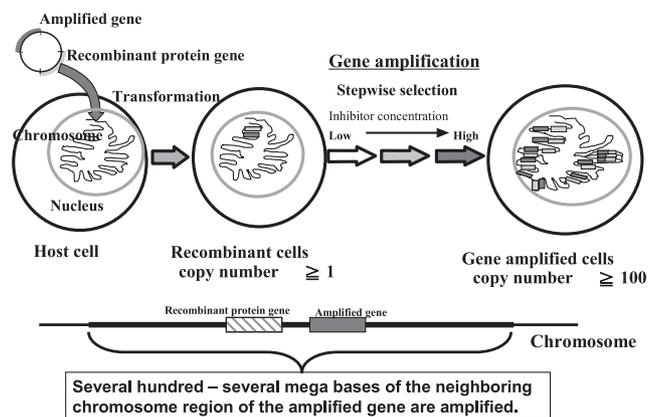


図1. 遺伝子増幅による高生産細胞構築<sup>5)</sup>

られる<sup>5)</sup>。

筆者らは、CHO DG44細胞-ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子増幅系において、さまざまな遺伝子増幅株構築条件における増幅位置と構築された細胞株の安定性について検討し、コピー数および安定性の異なる細胞では染色体上の増幅位置が異なることを示した<sup>6)</sup>。さらに筆者らはこの得られた細胞株の染色体を分析し、高コピー数を持つ細胞が、ある特定の染色体位置において増幅していることを見いだしている。このような染色体上に存在する高発現に関係する配列はHot Spotと呼ばれているが、その配列はほとんど明らかになっていない。そこで、構築したコピー数の高いCHO細胞株から遺伝子増幅に関連する配列情報を得るために、慶応大学の協力のもと、CHO細胞の全ゲノムを含むBACライブラリーを構築し増幅領域の解明を進めた。

**CHO細胞のBACライブラリーの構築** CHO細胞は1958年にPuckらによってチャイニーズハムスター卵巣組織から樹立され、Kaoらにより1968年に分離された亜種CHO-K1細胞株やChasinによって1978年に樹立されたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)欠損株CHO-DG44細胞<sup>7)</sup>が主体となって産業利用されている。CHO細胞のgenomic BACライブラリー構築にあたって対象とするCHO細胞として、我々が従前に構築したCHO-DR1000L-4N細胞<sup>6)</sup>を用いた。本細胞はCHO-DG44細胞にヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(hGM-CSF)遺伝子とマウスDhfr遺伝子を含むpSV2-dhfr/hGM-CSFベクターをエレクトロポレーションにて導入し、DHFR阻害剤であるMTX(methotrexate)濃度を段階的に増加させて得られた1000 nM MTX耐性細胞集団からクローニングによって構築された細胞株である。この細胞はfluorescent *in situ* hybridization (FISH)による画像解析とdot blottingを用いたコピー数測定結果から特定染色体上にDhfr遺伝子を約173コピー、hGM-CSF遺伝子を約166コピー安定に保持している<sup>6)</sup>。

BACベクターとして浅川らによって開発されたpBAC-Lacベクターを用いた<sup>8)</sup>。本ベクターはクロラムフェニコール耐性遺伝子を用いた薬剤選択が可能であり、lacZ遺伝子中にクローニングサイトを有するため、X-GalおよびIPTGを添加した寒天培地上で青白判定が可能である。BACライブラリーの構築に必要なインサートDNAとして通常100 kb以上のサイズを用いる。このようなサイズのDNAは通常のゲノム抽出操作では容易に切断されてしまう。そこで、浅川らの手法<sup>8)</sup>に従って、ゲルブロックを用いたゲノム抽出を行った。まず、CHO-DR1000L-4N細胞を $5 \times 10^6$  cells/mlとなるように調製し、これより

1.4%低融点アガロースを用いてゲルブロックを作製した。作製したゲルブロックをタンパク質分解酵素で処理した後に、Hind IIIを用いて染色体DNAを部分分解した。ゲルブロックから部分分解した長大DNAを取り出し、パルスフィールド電気泳動を行った。電気泳動後のゲルより、150-300 kb程度の画分および100-150 kb程度の画分をアガラーゼ処理にて取り出した。取り出したDNAをHindIIIにて切断したpBAC-Lacベクターとライゲーションさせた後、E. coli DH10Bへとエレクトロポレーションにて形質転換を行い、青白判定によってインサート配列を保持するBACクローンを取得した。白コロニーをQ pix (Genetix)を用いて384穴プレートに接種し、これをグリセロールストックとしてライブラリーを構築した。当初150-300kb程度の画分を用いてBACライブラリーを構築したが、白コロニーの得られる割合があまり高くなかったため、100-150kb程度の画分を中心にBACライブラリーを構築した。最終的に150-300kb程度の画分を用いて構築したライブラリーA(合計35,510クローン)と、100-150kb程度の画分を用いたライブラリーB(合計86,771クローン)からなるCHO genomic BACライブラリーを構築した。

青白判定にて選択した白コロニー中には目的とする大きな断片を保持していないクローンも存在する。そこで、ライブラリーからランダムにクローンを選択し、Not Iにて挿入領域を切り出し、パルスフィールド電気泳動にて挿入サイズを確認した(図2)。ライブラリーAでは平均挿入サイズが163 kb、ライブラリーBでは107 kbと推定された。さらに構築したライブラリーについてまとめると表1のようになる。

構築したライブラリーの全挿入サイズを合計すると約15.1 Gbのサイズとなる。ライブラリー構築の対象とし

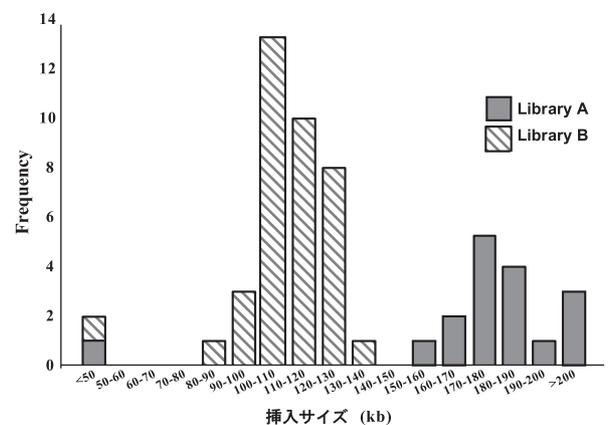


図2. 構築したCHOgenomic BACライブラリーの挿入サイズ分布(ライブラリーA, Bよりランダムに選択)

表1. 構築したCHO genomic BACライブラリー

ライブラリー	クローン数	384穴 プレート数	平均挿入 サイズ	全挿入 サイズ
A	35,510	102	163 kb	5.8 Gb
B	86,771	239	107 kb	9.3 Gb

たCHO細胞のゲノムサイズは現在はっきりとは判明していない。そこで、Chinese hamster (*Cricetulus griseus*)の細胞内全DNA含量<sup>9)</sup>より、Dolezelらの手法<sup>10)</sup>を用いて全ゲノムサイズを推定すると約3 Gbとなり、構築したライブラリーにてCHOのゲノムを5倍以上カバーしていると推定された。

**CHO細胞のBACライブラリーの活用** BACライブラリーの構築に用いたCHO-DR100L-4N細胞中には外来から導入された*Dhfr*遺伝子が増幅されている。これまで内在性の*Dhfr*遺伝子のamplicon構造は解明されている<sup>11,12)</sup>が、外来にて導入した*Dhfr*遺伝子の染色体上の増幅領域構造は十分には解明されていない。そこで、構築したライブラリーを基にして全ライブラリーをカバーするhigh-density-replica (HDR)を作製し、RI標識したDHFR cDNAをプローブとしてCHO染色体領域を含むBACクローンを選択した。22枚のHDRフィルターを用いてフィルターハイブリダイゼーションを行った結果、最終的に遺伝子増幅領域を含む9つのBACクローンが得られた。得られたBACクローンのうち、一つ(Cg0031N14)を選択し、これをプローブとしてCHO細胞へのtwo-color FISHを行い、増幅領域が含まれていることを確認した。現在、このクローンに含まれている増幅領域の解析を進めており、遺伝子増幅のメカニズムの解明の一端が、この結果によって明らかになると考えられる。

また、他のBACライブラリーの活用方法として、遺伝子増幅の宿主として汎用されているCHO DG44細胞において、BAC-FISHを用いたCHO細胞株識別染色体マーカーの構築を行っている。本手法を用いることにより、CHO DG44細胞における20本の染色体の識別が可能となり、遺伝子増幅細胞株構築過程や、CHO細胞株間に

おける染色体の変化を解明することが可能である。

構築したBACクローンのすべての塩基配列を決定することにより、CHO細胞の全ゲノム配列を明らかにすることが可能である。しかし、現在のシーケンス技術ではまだ多大な費用と時間が必要である。昨今の高速シーケンス技術の長足の進歩により数年後にはCHO細胞のゲノムがより安価でかつ高速に解明可能になると期待している。CHO細胞によるものづくりは、今後基盤情報の整備と共に、宿主細胞の改良と培養状態の解明が一段と加速して解析されると思われる。本分野は、微生物で開発された手法が応用可能であり、我が国の得意な分野を活かすことができる。一方、そのゲノムサイズの巨大さのために、一企業や一研究グループでのCHO細胞の解明には限界があり、取り組んでいる研究者も少ない。米国やシンガポールにおいては、ナショナルプロジェクトやコンソーシアムによる整備が進んでいる。公的資金による十分な基盤整備が現在早急に必要とされている。

CHO細胞genomic BACライブラリーの構築は慶応大学浅川修一先生および清水信義先生との共同研究である。本研究の一部は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託を受けて実施したものである。

## 文 献

- 1) 大政健史：化学と生物，**5**, 124 (2007).
- 2) 大政健史，奥村一夫：抗体医薬の最前線，シーエムシー出版 (2007).
- 3) Itzcoat, P.: *Abstr. Cell Culture Engineering X*, p.205, Whistler, Canada (2006).
- 4) Gatti, M. D. L. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 82 (2007).
- 5) Omasa, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 600 (2002).
- 6) Yoshikawa, T. *et al.*: *Biotech. Progress*, **16**, 710 (2000).
- 7) Urlaub, G. and Chasin, L. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4216 (1980).
- 8) Asakawa, S. *et al.*: *Gene*, **191**, 69 (1997).
- 9) Bachmann, K.: *Chromosoma*, **37**, 85 (1973).
- 10) Dolezel, J. *et al.*: *Cytometry A*, **51**, 127 (2003).
- 11) Looney, J. E. *et al.*: *Mol. Cell Biol.*, **7**, 569 (1987).
- 12) Sasaki, T. *et al.*: *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1051 (2006).