(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-34698
(P2012-34698A)
(43)公開日　平成24年2月23日(2012.2.23)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	102	4B065

審査請求 有　請求項の数 13　ＯＬ　（全 21 頁）

(21)出願番号　特願2011-203822 (P2011-203822)
(22)出願日　平成23年9月16日 (2011.9.16)
(62)分割の表示　特願2006-144663 (P2006-144663)の分割
原出願日　平成18年5月24日 (2006.5.24)

(71)出願人　504136568
国立大学法人広島大学
広島県東広島市鏡山１丁目３番２号
(74)代理人　110000338
特許業務法人原謙三国際特許事務所
(72)発明者　清水　典明
広島県東広島市鏡山１丁目７番１号　広島大学総合科学部内

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 CA01 DA02 EA04 GA13 HA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA05 CA24 CA44 CA46

(54)【発明の名称】遺伝子増幅効率の増加方法、および当該方法を行なうためのキット

(57)【要約】　（修正有）
【課題】哺乳動物細胞において所望の遺伝子を増幅する際に、遺伝子増幅効率を増加させる方法、および当該方法を行なうためのキットを提供する。
【解決手段】真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域と目的遺伝子とを哺乳動物細胞に導入する際に、逆方向反復配列（回分配列等）を導入する。上記複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来し、核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来することを特徴とする。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する導入工程、並びに
当該第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する選抜工程を行なって、第２ポリヌクレオチドを増幅する場合において、
以下に示される（２）の条件を満たすことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法：
（２）上記導入工程において、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドと同時に、逆方向反復配列を哺乳動物細胞へ導入する。
【請求項２】
以下に示す（３）の条件をさらに満たす、請求項１に記載の方法：
（３）上記プロモーターは、所定の操作によって転写活性が活性化または不活性化される転写活性調節型プロモーターであり、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なう。
【請求項３】
上記逆方向反復配列が、回文配列である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
上記真核生物細胞内で機能する複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来することを特徴とする請求項１ないし３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
上記核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来することを特徴とする請求項１ないし４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
請求項１に記載の方法を行なうためのキットであって、
真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含むポリヌクレオチドと、逆方向反復配列とを含むことを特徴とするキット。
【請求項７】
上記逆方向反復配列が、回文配列である、請求項６に記載のキット。
【請求項８】
上記真核生物細胞内で機能する複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来することを特徴とする請求項６または７に記載のキット。
【請求項９】
上記核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来することを特徴とする請求項６ないし８のいずれか１項に記載のキット。
【請求項１０】
発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する導入工程、並びに
当該第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する選抜工程を行なって、第２ポリヌクレオチドを増幅する場合において、以下に示される（２）の条件を満たすことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法：

（２）上記導入工程において、第３ポリヌクレオチドと同時に、逆方向反復配列を哺乳動物細胞へ導入する。

【請求項１１】

上記逆方向反復配列が、回文配列である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

請求項１０に記載の方法を行なうためのキットであって、

逆方向反復配列を含むことを特徴とするキット。

【請求項１３】

上記逆方向反復配列が、回文配列である、請求項１２に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、哺乳動物細胞において所望の遺伝子を増幅する際に、遺伝子増幅効率を増加させる方法、および当該方法を行なうためのキットを提供する。より好ましくは本発明は、本発明者が開発した「高度遺伝子増幅系」を用いて所望の遺伝子を増幅する際の遺伝子増幅効率をさらに増加させる方法、および当該方法を行なうためのキットに関する。

【背景技術】

【０００２】

本発明者は、哺乳動物複製開始領域（IR; initiation region）と核マトリックス結合領域（MAR; matrix attachment region）とを持つプラスミド（以下「IR/MAR プラスミド」という）をヒト由来がん細胞（COLO 320 大腸がん細胞株、およびHeLa細胞株）にリポフェクション法で導入し、プラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子（ブラスティサイジン（Blasticidine）あるいはネオマイシン（Neomycine））を利用して選択するだけで、

(1)発現させるべきタンパク質をコードする遺伝子（以下、適宜「目的遺伝子」という）の細胞内コピー数を１万コピー程度にまで増幅できること、および、

(2)目的遺伝子はIR/MAR プラスミドに対して同一の遺伝子構築物（シス）として導入した場合であっても、別の遺伝子構築物（トランス）として導入した場合であっても、高度に増幅することができるということを発見した（特許文献１および非特許文献１参照）。そして、本発明者は当該知見に基づいて、IR/MAR プラスミドと目的遺伝子とを、哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来がん細胞（COLO 320 大腸がん細胞株、およびHeLa細胞株）、ＣＨＯ細胞等）にリポフェクション法で導入し、プラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子（BlasticidineあるいはNeomycine ）を利用して選択するだけで、目的遺伝子を１万コピー程度に増幅できる系（以下、「高度遺伝子増幅系」という）を完成させるに至った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００３】

【特許文献１】特開２００３－２４５０８３号公報（公開日：平成１５（２００３）年９月２日）

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Noriaki Shimizu, et al. (2001) Plasmids with a Mammalian Replication Origin and a Matrix Attachment Region Initiate the Event Similar to Gene Amplification. Cancer Research vol.61, no.19, p6987-6990.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明は、上記高度遺伝子増幅系における遺伝子増幅効率をさらに向上させることを目的とした。また本発明は上記高度遺伝子増幅系を用いない場合においても、導入された目的遺伝子の増幅効率を向上させる方法、および当該方法を行なうためのキットを提供することを目的とした。

【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明者は、上記課題を解決すべく上記高度遺伝子増幅系を用いて鋭意検討を行なったところ、以下の（１）～（３）に示す少なくとも１つ以上の条件を満たすことによって、遺伝子増幅効率をさらに向上することができることを発見し、本発明を完成させるに至った：
（１）形質転換哺乳動物細胞を低酸素濃度条件下で培養する；
（２）逆方向反復配列（例えば回分配列）を哺乳動物細胞に導入する；
（３）転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で遺伝子導入および形質転換細胞の選抜を行なう。
【０００７】
特に本発明は以下の発明を包含する。
【０００８】
すなわち、本発明にかかる方法は、(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する導入工程、並びに、
当該第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する選抜工程を行なって、第２ポリヌクレオチドを増幅する場合において、
以下に示される（２）の条件を満たすことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法である。
（２）上記導入工程において、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドと同時に、逆方向反復配列を哺乳動物細胞へ導入する。
【０００９】
本発明にかかる方法は、以下に示す（３）の条件をさらに満たしていてもよい。
（３）上記プロモーターは、所定の操作によって転写活性が活性化または不活性化される転写活性調節型プロモーターであり、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なう。
【００１０】
本発明にかかる方法は、上記逆方向反復配列が、回文配列であってもよい。
【００１１】
また本発明にかかる方法は、上記真核生物細胞内で機能する複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来していてもよい。
【００１２】
また本発明にかかる方法は、上記核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来していてもよい。
【００１３】
また本発明にかかるキットは上記本発明にかかる方法を行なうためのキットであって、真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含むポリヌクレオチドと、逆方向反復配列とを含むことを特徴としている。
【００１４】
本発明にかかるキットにおいて上記逆方向反復配列は、回文配列であってもよい。
【００１５】
また本発明にかかるキットは、上記真核生物細胞内で機能する複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来していてもよい。
【００１６】

また本発明にかかるキットは、上記核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来していてもよい。

【発明の効果】

【００１７】

本発明によれば、高度遺伝子増幅系を用いて、または当該高度遺伝子増幅系を用いることなく目的遺伝子を増幅する際に、遺伝子増幅効率を増加させることが可能となる。それゆえ本発明によれば、所望のタンパク質（例えば有用タンパク質）を大量に生産することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】ｐΔＢＮＡＲ１が導入された形質転換細胞の多クローン性集団に関する遺伝子増幅構造形成頻度を示す棒グラフである。

【図２】ｐΔＢＮＴＲＥが導入された形質転換細胞の多クローン性集団に関する遺伝子増幅構造形成頻度を示す棒グラフである。

【図３】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合、または通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合における遺伝子増幅構造形成頻度を示す棒グラフである。

【図４】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合、または通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合におけるd2EGFP発現量を示す棒グラフである。

【図５】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図６】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の低酸素濃度条件（１０％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図７】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の低酸素濃度条件（５％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図８】pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合、または通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合における遺伝子増幅構造形成頻度を示す棒グラフである。

【図９】pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合、または通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合におけるd2EGFP発現量を示す棒グラフである。

【図１０】pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図１１】pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の低酸素濃度条件（１０％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図１２】pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞を通常の低酸素濃度条件（５％（ｖ/ｖ））で培養した場合において、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である。

【図１３】pΔBN.Palimdの構造を示す模式図である。

【図１４】pΔBN.Palindが導入されたＣＨＯ細胞の増幅構造形成頻度の結果を示す棒グラフである。

【図１５】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞の増幅構造形成頻度の結果を示す棒グラフである。

【図１６】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(I)～(V)の各パターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量を示す棒グラフである。
【図１７】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(I)のパターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果である。
【図１８】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(II)のパターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果である。
【図１９】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(III)のパターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果である。
【図２０】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(IV)のパターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果である。
【図２１】pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に対して、(V)のパターンにおいてDoxを添加した場合における、d2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果である。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
本発明の実施の形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。
【００２０】
本発明にかかる方法は、高度遺伝子増幅系を用いて、または当該高度遺伝子増幅系を用いることなく目的遺伝子を増幅する際に、遺伝子増幅効率を増加させる方法に関するものである。
【００２１】
ここで本発明において「遺伝子増幅効率を増加させる」とは、本発明の方法を実施することによって、本発明が実施されていない場合に比して、形質転換細胞の遺伝子増幅構造形成頻度を向上させることを意味する。上記「遺伝子増幅構造形成頻度」は、多クローン性集団に含まれる当該増幅構造が形成されたクローンの割合を計算することにより求めることができる。増幅遺伝子の増幅構造は、染色体外のダブルマイニュート染色体（以下、適宜「ＤＭ」という）上、または染色体の均一染色領域（Homogeneously staining regeon；以下、適宜「ＨＳＲ」という）で小型増幅領域として増幅される場合、ＨＳＲで大型増幅領域または中型増幅領域として増幅される場合がある。形質転換細胞のクローンについて増幅構造が形成されたかを判断する方法については、特に限定されるものではないが、例えば分裂期の染色体について公知のＦＩＳＨ法（fluorescence in situ hybridization）を行ない、哺乳動物細胞へ導入した遺伝子を検出することによって判断し得る。上記判断は、当業者であれば容易に行ない得る。なおＦＩＳＨ法を実施する際の具体的な方法については特に限定されるものではなく、従来公知の方法を適宜選択の上、採用すればよい。
【００２２】
また上記ＦＩＳＨ法を行なうことによって、ＤＭ上で小型増幅領域として増幅された、ＨＳＲで小型増幅領域として増幅された、ＨＳＲで中型増幅領域として増幅された、または大型増幅領域として増幅されかを判断し得る。より具体的には、ＤＭ上に蛍光を示すか、またはＨＳＲで蛍光を示すかを検出することによって、目的遺伝子がＤＭ上で増幅されたか、またはＨＳＲ上で増幅されたかをまず判断し得る。ＨＳＲは染色体上の領域であるのに対して、ＤＭは染色体外に存在するため、蛍光顕微鏡観察を行なうことによって、両者の区別は容易に行ない得る。また目的遺伝子が大型増幅領域として増幅されたか、中型増幅領域として増幅されたか、または小型増幅領域として増幅されたかについては、例えば、”The ACT Cytogenetics Laboratory Manual (second edition” edited by Margaret J. Barch, Raven Press (1991) に記載された方法にしたがって分裂間期染色体標本を作製し、分裂間期染色体標本中で、染色体腕の幅を基準にして、それよりも増幅領域の長さが長ければ大型、同程度であれば中型、それより短ければ小型、といったようにして判断することができる。
【００２３】

また「遺伝子増幅効率を増加させる」とは、本発明の方法を実施していない場合に比べて遺伝子増幅構造形成頻度を上昇させることをいう。より具体的には、ＤＭ上で遺伝子増幅が行われている頻度を、本発明の方法を実施していない場合に比して上昇させること、あるいはＨＳＲで遺伝子が増幅している場合には、本発明の方法を実施していない場合に比してより長い増幅形態をとる（すなわち増幅領域が長くなる）頻度を上昇させることをいう。

【００２４】

本発明にかかる方法は、(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、

(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する導入工程、並びに、

当該第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する選抜工程を行なって、第２ポリヌクレオチドを増幅する場合において、以下に示される（１）または（２）のいずれか１つ以上の条件を満たすことを特徴としている：

（１）上記選抜工程において、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を、哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養する；

（２）上記導入工程において、第２ポリヌクレオチドの回文配列を、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドと同時に、哺乳動物細胞へ導入する。

【００２５】

また本発明にかかる方法は、以下に示す（３）の工程をさらに含む方法であってもよい：

（３）上記プロモーターは、所定の操作によって転写活性が活性化または不活性化される転写活性調節型プロモーターであり、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なう。すなわち本発明にかかる方法には、上記（１）の条件、（２）の条件、（１）＋（２）の条件、（１）＋（３）の条件、（２）＋（３）の条件、または（１）＋（２）＋（３）の条件、を満たす場合が含まれる。

【００２６】

本発明にかかる方法には、上記当該選抜工程によって選抜された哺乳動物細胞を培養する培養工程が含まれていてもよい。以下、本発明にかかる方法を工程ごとに説明する。

【００２７】

＜導入工程＞

本発明にかかる方法における導入工程は、

(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、

(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する工程である。

【００２８】

上記第１ポリヌクレオチドには、真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域が含まれている。かかる第１ポリヌクレオチドに含まれる複製起点としては真核生物細胞内で機能するものであれば特に限定されるものではなく、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、β-グロビン遺伝子座等の複製起点が挙げられる。なおc-myc遺伝子座の複製起点については、「McWhinney, C. et al., Nucleic Acids Res. vol. 18, p1233-1242 (1990)」参照のこと。またジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の複製起点については、「Dijkwel, P.A. et al., Mol. Cell. Biol. vol.8, p5398-5409 (1988) 」参照のこと。またβ-グロビン遺伝子座の複製起点については、「Aladjem, M. e

t al., Science vol. 281, p1005-1009 (1998) 」参照のこと。

【００２９】

また第１ポリヌクレオチドに含まれる核マトリックス結合領域としては、真核生物細胞内で機能するものであれば特に限定されるものではなく、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座等の核マトリックス結合領域に由来する配列が挙げられる。なお、Igκ遺伝子座の核マトリックス結合領域については、「Tsutsui, K. et al., J. Biol. Chem. vol. 268, p12886-12894 (1993) 」参照のこと。またSV40初期領域の核マトリックス結合領域については、「Pommier, Y. et al., J. Virol., vol 64, p419-423 (1990) 」参照のこと。またジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域については、「Shimizu N. et al., Cancer Res. vol. 61, p6987-6990 」参照のこと。

【００３０】

なお上記第１ポリヌクレオチドには、この他、適宜目的に応じて、大腸菌内でクローニングを行なうために必要な配列、および／または、選択マーカー（マーカータンパク質）としての薬剤耐性遺伝子(ブラスティサイジン抵抗性遺伝子、ネオマイシン抵抗性遺伝子、ヒグロマイシン抵抗性遺伝子等)または緑色蛍光タンパク質遺伝子等が含まれていてもよい。これらの選択マーカーを指標とすることによって、第１ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選別できる。

【００３１】

一方、第２ポリヌクレオチドは、発現させるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチド（すなわち「目的遺伝子」）であり、特に限定されるものではなく、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを適宜選択の上、採用すればよい。第２ポリヌクレオチドは、その塩基配列情報を元にＰＣＲ等の公知の技術を用いて取得すればよい。なお本発明の説明において「発現させるべきタンパク質」のことを、適宜「目的タンパク質」と称する。

【００３２】

また本発明にかかる方法において利用する、第３ポリヌクレオチドは、第２ポリヌクレオチドが、プロモーターに制御可能に連結されているポリヌクレオチドを含むものである。上記プロモーターは、導入される哺乳動物細胞において機能するものであれば特に限定されるものではなく、転写因子等による所定の操作によって、プロモーターの転写活性が活性化または不活性化されるプロモーター（本明細書においては「転写活性調節型プロモーター」という）であっても、恒常的に転写活性が活性化されている恒常型プロモーターであってもよい。「転写活性調節型プロモーター」は、上記特性を有するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、ＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）、Ｔ－ＲＥＸプロモーター（インビトロジェン社製）等の市販品が本発明にかかる方法において利用可能である。恒常型プロモーターとしては、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、SRalphaプロモーター、ＬＴＲプロモーター、ＭＭＴＶプロモーター等が利用可能である。

【００３３】

上記第１ポリヌクレオチド、および第３ポリヌクレオチドが、哺乳動物細胞へ同時に導入されることによって、本発明者が特許文献１等に開示した「高度遺伝子増幅系」を構成することができ、当該哺乳動物細胞において第２ポリヌクレオチドを高度に増幅することが可能となる。上記哺乳動物細胞は、特に限定されるものではなく、例えばＣＨＯ－Ｋ１細胞（入手先：例えば、ATCC CCL-61、RIKEN RCB0285、RIKEN RCB0403等）、各種腫瘍細胞等が挙げられる。ただし、上記哺乳動物細胞としては、無限増殖能を有する腫瘍細胞が特に好ましい。上記腫瘍細胞としては、例えば、ＨｅＬａ細胞（入手先：例えば、ATCC CCL-2、ATCC CCL-2.2、RIKEN RCB0007、RIKEN RCB0191等）、ヒト大腸がんCOLO 320DM細胞（入手先：例えば、ATCC CCL-220）、ヒト大腸がんCOLO 320HSR細胞（入手先：例えば、ATCC CCL-220.1）、ＮＳ０細胞（入手先：例えば、RIKEN RCB0213）等が挙げられる。なおヒト大腸がんCOLO 320DM細胞については、「Shimizu, N., Kanda, T., and Wahl, G. M.

Selective capture of acentricfragments by micronuclei provides a rapid method for purifying extrachromosomally amplified DNA. Nat. Genet., 12: 65－71, 1996.」参照のこと。

【００３４】

なお、第１および第３ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入する際には、両ポリヌクレオチドが同時に哺乳動物細胞へ導入される態様であれば特に限定されるものではなく、両ポリヌクレオチドを連結して同一の遺伝子構築物として導入してもよいし、おのおの別々の遺伝子構築物として導入してもよい。また遺伝子構築物の形態については、プラスミドであってもコスミドであってもよい。また第１および第３ポリヌクレオチドの哺乳動物細胞への導入方法は、特に限定されるものではなく、リポフェクション、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等公知の方法を適宜選択の上、採用すればよい。

【００３５】

なお第１および３ポリヌクレオチドを別の遺伝子構築物として導入する場合には、それぞれの遺伝子構築物に選択マーカーをコードする遺伝子が含まれていることが好ましい。上記ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜することができるからである。この時、第１ポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物に含まれる選択マーカーと、第３ポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物に含まれる選択マーカーとが異なることが好ましいことはいうまでもない。

【００３６】

また本発明にかかる方法は、当該プロモーターの転写因子をコードするポリヌクレオチド（第４ポリヌクレオチド）を哺乳動物細胞に導入して転写活性化因子を発現させる工程を包含していてもよい。かかる工程によれば、目的タンパク質の発現を制御するプロモーターの転写活性を調節することができ、目的タンパク質の発現を適宜調節することができるという効果を奏する。ここで第４ポリヌクレオチドとは、上記第３ポリヌクレオチドに含まれるプロモーターの転写因子をコードするポリヌクレオチドのことである。例えば、プロモーターとしてＴＲＥプロモーターを用いた場合には、Ｔｅｔ－ＯＮタンパク質をコードするポリヌクレオチド（「Ｔｅｔ－ＯＮ遺伝子（クロンテック社製）」という）、またはＴｅｔ－ＯＦＦタンパク質をコードするポリヌクレオチド（「Ｔｅｔ－ＯＦＦ遺伝子（クロンテック社製）」という）を第４ポリヌクレオチドとすればよい。第４ポリヌクレオチドを上記哺乳動物細胞に導入して転写活性化因子を発現させる工程では、かかる第４ポリヌクレオチドと当該第４ポリヌクレオチドを発現させるためのプロモーターとを制御可能に連結して構築した遺伝子構築物を哺乳動物細胞に導入すればよい。当該第４ポリヌクレオチドを発現させるためのプロモーターは、哺乳動物細胞において機能するものであれば特に限定されるものではなく、転写活性調節型プロモーターであっても、恒常型プロモーターであってもよい。

【００３７】

また第４ポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物の哺乳動物細胞への導入の時期は、上記第１および第３ポリヌクレオチドの導入後に第４ポリヌクレオチドを導入してもよいし、またその逆であってもよい。さらに上記第１および第３ポリヌクレオチドの導入と同時に第４ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞へ導入してもよい。本発明者の検討によれば、上記第１および第３ポリヌクレオチドの導入と同時に第４ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞へ導入した方が、目的タンパク質が高発現するとの知見が得られているため、同時に導入することが最も好ましい。なお第４ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞へ導入する際には、第４ポリヌクレオチドを導入するための遺伝子構築物に選択マーカーをコードする遺伝子が含まれていることが好ましい。上記ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜することができるからである。この時、第１および／または３ポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物に含まれる選択マーカーと、第４ポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物に含まれる選択マーカーとが異なることが好ましいことはいうまでもない。なお遺伝子構築物の形態、哺乳動物細胞への導入方法については、既述の第１および第３ポリヌクレオチドの場合と同様にすればよい。

【００３８】
本発明にかかる方法では、上記導入工程において、回文配列（「Palindrome」ともいう）をはじめとする逆方向反復配列を、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドと同時に、哺乳動物細胞へ導入することを１つの特徴としている。ここで本発明の説明において「逆方向反復配列」および「回分配列」とは、「逆方向反復配列よりなるポリヌクレオチド」および「回分配列よりなるポリヌクレオチド」のことをそれぞれ意味する。なお逆方向反復配列および回分配列については、例えば分子生物学辞典　第１版　第４刷（発行：東京化学同人、発行日：１９９９年７月１日）に記載されている。また上記回文配列をはじめとする逆方向反復配列は、通常の遺伝子工学的手法を用いて作製し得るため、当業者であれば容易に作製し得る。

【００３９】
回文配列をはじめとする逆方向反復配列を哺乳動物細胞へ導入する際には、
(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、
(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチドおよびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドと、
(iii)逆方向反復配列（回分配列）とを、哺乳動物細胞へ同時に導入すればよい。
かかる場合、第１ポリヌクレオチド、第３ポリヌクレオチド、および逆方向反復配列（回分配列）をすべて連結し、同一の遺伝子構築物として哺乳動物細胞へ導入してもよいし、それぞれを連結せずに別々の遺伝子構築物として導入してもよい。また第１ポリヌクレオチドと逆方向反復配列（回分配列）とを同一の遺伝子構築物とし、第３ポリヌクレオチドを別の遺伝子構築物として哺乳動物細胞に導入してもよい。また第３ポリヌクレオチドと逆方向反復配列（回分配列）とを同一の遺伝子構築物とし、第１ポリヌクレオチドを別の遺伝子構築物として哺乳動物細胞に導入してもよい。さらに第１ポリヌクレオチドと第３ポリヌクレオチドとを同一の遺伝子構築物とし、逆方向反復配列（回分配列）を別の遺伝子構築物として哺乳動物細胞に導入してもよい。

【００４０】
なお、本発明の方法において利用される逆方向反復配列（回分配列）の長さは、特に限定されるものではないが、５０ｂｐ以上１０００ｂｐ以下が好ましく、１００ｂｐ以上４００ｂｐ以下がさらに好ましい。上記好ましい範囲であれば、高い細胞増殖効率と高い遺伝子増幅効率とを両立し易くなる。

【００４１】
また、本発明の方法において利用される逆方向反復配列（回分配列）の塩基配列は、逆方向反復配列（回分配列）となっている以外は特に限定されるものではなく、タンパク質をコードするものであっても、コードしないものであってもよい。後述する実施例においては、d2EGFP構造遺伝子を用いて逆方向反復配列（回分配列）作製している。なお逆方向反復配列（回分配列）は、任意のヌクレオチド鎖を化学合成等の公知の手法により適宜調製してもよい。

【００４２】
本発明者は、逆方向反復配列（回分配列）を哺乳動物細胞へ導入した際に、遺伝子の増幅効率が増加することを見出した。上記のごとく逆方向反復配列（回文配列）を宿主細胞へ導入することによって遺伝子の増幅効率が向上するメカニズムの詳細は現時点では不明であるが、逆方向反復配列（回分配列）の位置でＤＮＡの２本鎖切断が生じ、それが遺伝子増幅の引き金となるためではないかと発明者は推察している。

【００４３】
また本発明にかかる方法は、以下の条件を満たす方法であってもよい。
第３のポリヌクレオチドに含まれるプロモーターが転写活性調節型プロモーターであり、かつ転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なう。

【００４４】
上記プロモーターの転写活性を、活性化させたり、または不活性化させたりする方法は、プロモーターに応じた所定の方法により行なえばよい。より具体的には、プロモーターが転写活性化因子の存在によってその転写活性が活性化されるプロモーターである場合には、導入工程および選抜工程を行なう系内に転写活性化因子を存在させずに導入工程および選抜工程を行なえばよく、逆に当該プロモーターが転写不活性化因子の存在によってその転写活性が不活性化されるプロモーターである場合には、導入工程および選抜工程を行なう系内に転写不活性化因子を存在させて導入工程および選抜工程を行なえばよい。
【００４５】
例えば、第３ポリヌクレオチドに含まれる転写活性調節型プロモーターとして、ＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）を用い、当該プロモーターの転写活性化因子をコードするＴｅｔ－ＯＮ遺伝子（クロンテック社製）を第４ポリヌクレオチドとして用いた場合には、テトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の非存在下で第２ポリヌクレオチド、第３ポリヌクレオチド、および第４ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入し、さらにテトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の非存在下で選抜工程を実施すればよい。Ｔｅｔ－ＯＮタンパク質（クロンテック社製）は、ＴＲＥプロモーターと結合する転写活性化因子であり、テトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の存在下でＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）の転写活性が活性化される。
【００４６】
一方、第３ポリヌクレオチドに含まれる転写活性調節型プロモーターとして、ＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）を用い、当該プロモーターの転写活性化因子をコードするＴｅｔ－ＯＦＦ遺伝子（クロンテック社製）を第４ポリヌクレオチドとして用いた場合には、テトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の存在下で第２ポリヌクレオチド、第３ポリヌクレオチド、および第４ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入し、さらにテトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の存在下で選抜工程を実施すればよい。Ｔｅｔ－ＯＦＦタンパク質（クロンテック社製）は、ＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）と結合する転写活性化因子であり、テトラサイクリン（Doxycycline（クロンテック社製））の存在下でＴＲＥプロモーター（クロンテック社製）の転写活性が不活性化される。
【００４７】
転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なうことによって、遺伝子の増幅効率が向上するメカニズムの詳細は現時点では不明であるが、プロモーターからの転写が生じていると、それがＩＲからの複製フォークと正面衝突することによりＤＮＡの２本鎖切断があらゆる箇所で頻繁に激しく生じるために、一旦形成された遺伝子増幅構造が破壊されてしまうのに対して、プロモーターからの転写が生じていない状態では遺伝子増幅構造の破壊が起こり難いために遺伝子の増幅効率が向上するのではないかと、発明者は推察している。なお、ＤＮＡの２本鎖切断は遺伝子増幅の引き金となるが、上記のとおり２本鎖切断があらゆる箇所で頻繁に激しく生じればもはや修復不可能となり遺伝子増幅構造の破壊につながるものと考えられる。
【００４８】
＜選抜工程＞
本発明にかかる方法の「選抜工程」は、上記第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する工程である。より詳細には、本工程は、上記第１および第３ポリヌクレオチドが導入されていない哺乳動物細胞、および第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞が含まれる細胞の多クローン性集団から後者の細胞を選抜する工程である。なお、薬剤耐性を指標として本工程を行なう場合には、哺乳動物細胞を培地で培養する工程が含まれる場合があるが、本工程では第１および第３ポリヌクレオチドが導入されていない哺乳動物細胞、および第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞が含まれる細胞の混合物を培養するのに対して、後述する培養工程は第１

および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞として既に選抜された細胞を培養する点において、両工程は明らかに相違する。かかる選抜工程によって、哺乳動物細胞に導入された第２ポリヌクレオチド（目的遺伝子）が高度に増幅された哺乳動物細胞を選抜することができる。

【００４９】

上記選抜工程の具体的方法は特に限定されるものではないが、例えば、第１および第３ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞へ導入する際に用いた遺伝子構築物に薬剤耐性遺伝子が含まれている場合、その薬剤耐性を利用して第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜すればよい。

【００５０】

本発明にかかる方法は、上記のごとく選抜工程に第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を培養する工程が含まれる態様において、哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養することを特徴点の一つとしている。「低酸素濃度条件下」とは、哺乳動物細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、当該哺乳動物細胞が通常培養される酸素濃度未満であることを意味する。「哺乳動物細胞が通常培養される酸素濃度」は、細胞によって異なるために一義的に決定されるものではないが、通常の哺乳動物細胞であれば２０％（ｖ/ｖ）である。よって、低酸素濃度条件下とは、哺乳動物細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、２０％（ｖ/ｖ）未満である場合がある。なお哺乳動物細胞を低酸素条件下で培養する際の酸素濃度は、５％（ｖ/ｖ）以上２０％（ｖ/ｖ）未満が好ましく、５％（ｖ/ｖ）以上１０％（ｖ/ｖ）未満がさらに好ましい。上記好ましい範囲内であれば、哺乳動物細胞が増殖し易く、かつ遺伝子増幅効率の増加効果が得られやすい。なお「％（ｖ/ｖ）」は「体積パーセント」を意味し、「％　ｖ／ｖ」または「％　vol／vol」とも表記する。

【００５１】

哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養することによって、遺伝子の増幅効率が向上するメカニズムの詳細は現時点では不明であるが、低酸素濃度下ではＤＮＡ２本鎖切断が生じる場合があり、それが遺伝子増幅の引き金となるのではないかと発明者は推察している。

【００５２】

なお、本発明の方法における選抜工程は、ＰＣＲ法やサザンブロット法によって、哺乳動物細胞に含まれる第１および第３ポリヌクレオチドまたはそのヌクレオチド断片を検出することによっても行ない得る。上記薬剤耐性、ＰＣＲ法、サザンブロット法の具体的な方法は、特に限定されるものではなく、公知の方法が適宜利用され得る。

【００５３】

＜培養工程＞

本発明にかかる方法の「培養工程」は、上記選抜工程によって既に選抜された哺乳動物細胞を培養する工程である。かかる培養工程によって、第２ポリヌクレオチド（目的遺伝子）が導入され且つ高度に増幅された哺乳動物細胞を増殖させることができ、所定の操作（転写誘導操作）によって、目的タンパク質を生産することができる。

【００５４】

上記培養工程の具体的方法は特に限定されるものではなく、培養する哺乳動物細胞に最適な条件を検討の上、適宜採用すればよい。かかる培養工程における、培養雰囲気中の酸素濃度は特に限定されるものではなく、通常の酸素濃度条件であっても、低酸素条件下であってもよい。ただし、本発明者の検討によれば、後者の条件で培養する方が目的タンパク質の高い発現量が得られる傾向にあるため、培養工程においても低酸素条件下で哺乳動物細胞を培養する方が好ましいといえる。

【００５５】

なお本発明は、上記で説示した本発明にかかる方法を行なうためのキットをも包含する。すなわち、本発明にかかるキットは、真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含むポリヌクレオチドと、逆方向反復配列とを含むことを特徴として

いる。本発明にかかるキットは、本発明にかかる方法を実施し得るものであれば、上記構成に限定されるものではなく、その他の構成を含んでいてもよい。なお、本発明にかかるキットを構成する物品等の説明については、本発明にかかる方法の説明を適宜援用することができる。

【００５６】

ところで、上記説示した本発明にかかる方法は、本発明者が開発した高度遺伝子増幅系以外の系、すなわちＩＲとＭＡＲを利用しない通常の系においても適用し得る。具体的には、発現させるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を、哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法も本発明は包含する。さらには、発現させるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および逆方向反復配列（回分配列）を、哺乳動物細胞へ同時に導入する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法も本発明は包含する。さらには、逆方向反復配列（回分配列）を含むことを特徴とする、遺伝子増幅効率を増加させる方法を実施するためのキットをも本発明は包含する。高度遺伝子増幅系以外の系を用いた態様の説明は、ＩＲとＭＡＲの説明を除き、既述の説明を適宜援用し得る。

【００５７】

本発明は、以下の通りに表現することができる。すなわち本発明にかかる方法は遺伝子増幅効率を増加させる方法であって、上記課題を解決するために、

(i)真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含む第１ポリヌクレオチドと、

(ii)発現させるべきタンパク質をコードする第２ポリヌクレオチド、およびプロモーターを含むポリヌクレオチドであり、かつ当該第２ポリヌクレオチドが当該プロモーターに制御可能に連結されている第３ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞へ同時に導入する導入工程、並びに、

当該第１および第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を選抜する選抜工程を行なって、第２ポリヌクレオチドを増幅する場合において、以下に示される（１）または（２）のいずれか１つ以上の条件を満たすことを特徴としている：

（１）上記選抜工程において、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を、哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養する；

（２）上記導入工程において、第１ポリヌクレオチドおよび第３ポリヌクレオチドと同時に、逆方向反復配列を哺乳動物細胞へ導入する。

【００５８】

また本発明にかかる方法は、以下に示す（３）の条件をさらに満たす方法であってもよい：

（３）上記プロモーターは、所定の操作によって転写活性が活性化または不活性化される転写活性調節型プロモーターであり、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なう。

【００５９】

また本発明にかかる方法は、上記逆方向反復配列が、回文配列であってもよい。

【００６０】

また本発明にかかる方法は、上記真核生物細胞内で機能する複製起点が、c-myc遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、またはβ-グロビン遺伝子座の複製起点に由来するものであってもよい。

【００６１】

また本発明にかかる方法は、上記核マトリックス結合領域が、Igκ遺伝子座、SV40初期領域、またはジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の核マトリックス結合領域に由来するものであってもよい。

【００６２】

また本発明にかかる方法は、上記低酸素濃度条件が、酸素濃度２０％（ｖ/ｖ）未満であってもよい。

【００６３】

また本発明は、上記方法を行なうためのキットであって、

真核生物細胞内で機能する複製起点および核マトリックス結合領域を含むポリヌクレオチドと、逆方向反復配列とを含むことを特徴とするキットをも包含する。

【００６４】

また本発明は、発現させるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチドが導入された哺乳動物細胞を、哺乳動物細胞を通常培養する酸素濃度未満である低酸素濃度条件下で培養する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法をも包含する。

【００６５】

また本発明は、発現させるべきタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、逆方向反復配列とを、哺乳動物細胞へ同時に導入する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅効率を増加させる方法をも包含する。さらに本発明は、上記方法を行なうためのキットであって、逆方向反復配列を含むことを特徴とするキットをも包含する。

【００６６】

以下添付した図面に沿って実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【００６７】

また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【実施例】

【００６８】

〔実施例１〕

（方法）

ブラスティサイジン抵抗性遺伝子（「ＢＳＲ」と適宜表記する）、ＩＲおよびＭＡＲを持った２種類のプラスミド（ｐΔＢＮＡＲ１およびｐΔＢＮＴＲＥ）を、それぞれＣＨＯ－Ｋ１細胞（以下「ＣＨＯ細胞」という）にリポフェクションにより導入した。その後、形質転換体を５μｇ／ｍｌブラスティサイジンにより選抜した。ブラスティサイジンによる選抜の際に、培養雰囲気中の酸素濃度を、通常の２０％（ｖ/ｖ）、低酸素条件の１０％（ｖ/ｖ）、または低酸素条件の５％（ｖ/ｖ）にしてＣＨＯ細胞の培養を行なった。４週間培養後、細胞を固定し、プラスミドプローブを用いてＦＩＳＨを行なった。

【００６９】

ｐΔＢＮＡＲ１は、pSFVdhfrをBam HIおよびNru Iの同時消化によってヒグロマイシン抵抗性遺伝子を発現する部分を除去し、その後一旦クローン化した後に、ＢＳＲの下流でジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座の複製起点（「DHFR IR」と適宜表記する）と接している部分にあるNot Iサイトで切断して、その位置にＭＡＲ活性を持つＡＲ１を挿入することにより構築された。なお上記ＡＲ１は、「N. Shimizu, et al. (2001) Cancer Research , vol.61, p6987-6990.」に記載の方法によって取得された。

【００７０】

またｐΔＢＮＴＲＥは、pSFVdhfrをBam HIおよびNru Iの同時消化によってヒグロマイシン抵抗性遺伝子を発現する部分を除去した後、その位置に、TRE promoter-マルチクローニングサイト（「MCS」と表記する）-SV40 polyAの配列を挿入することで構築された。なお上記TRE promoter-MCS-SV40 polyAの配列は、pTRE2Hyg（Clontech社より購入）をXho IおよびAse II消化することによって得られた。

【００７１】

pSFVdhfr（11.0kbp）は、John Kolman 博士および Geoffrey M. Wahl 博士(The Salk Institute, San Diego, CA)から供与された。PSFVdhfrはヒドロ葉酸リダクターゼに対して3'-下流の領域に由来するOriβを含む4.6kbp断片を有している（「Dijkwel, P. A., and Hamlin, J. L. Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. Mol. Cell Biol., 8: 5398－5409, 1988.」参照）。

【００７２】

ＣＨＯ細胞は、東北大学加齢医学研究所　医用細胞資源センターより入手された。細胞培養は、上記細胞株をD-MEM/F-12培地（Gibco社製）へ１０％牛胎児血清を添加した培地中で、３７℃、５％ CO_2存在下で行われた。

【００７３】

上記のプラスミドを、Qiagenプラスミド精製キット(Qiagen Inc., Valencia, CA)により精製し、GenePorter 2リポフェクションキット(Gene Therapy Systems, San Diego, CA)により細胞にトランスフェクトした。

【００７４】

ＦＩＳＨ法は、細胞に導入したものと同じプラスミドＤＮＡをビオチンまたはＤＩＧ（ジゴキシゲニン：Digoxigein）標識したものをプローブとし、形質転換体細胞から調製した染色体標本との間でハイブリダイゼーションを行なった後、ハイブリダイズしたプローブを蛍光色素で検出することによって行なわれた。

【００７５】

（結果）

図１にｐΔＢＮＡＲ１が導入された形質転換細胞の多クローン性集団において遺伝子増幅構造（遺伝子がＨＳＲで小型増幅領域として増幅されている（「小型ＨＳＲ」で示す）、遺伝子がＨＳＲで中型増幅領域として増幅されている（「中型ＨＳＲ」で示す）、および遺伝子がＨＳＲで大型増幅領域として増幅されている（「大型ＨＳＲ」で示す））が形成された頻度（すなわち「遺伝子増幅構造形成頻度」）を示した。また図２にｐΔＢＮＴＲＥが導入された形質転換細胞の多クローン性集団において遺伝子増幅構造（小型ＨＳＲ、中型ＨＳＲ、および大型ＨＳＲ）が形成された頻度を示した。なお遺伝子増幅構造形成頻度（単に「増幅構造形成頻度」ともいう）の合計が大きいほど、遺伝子増幅効率が高いことを示している。また小型ＨＳＲ→中型ＨＳＲ→大型ＨＳＲの順に増幅構造が大きくなればなるほど、細胞あたりの目的遺伝子のコピー数を顕著に増加させることができるというメリットを享受できる。増幅構造の大きさについては、”The ACT Cytogenetics Laboratory Manual (second edition” edited by Margaret J. Barch, Raven Press (1991)に記載された方法にしたがって分裂間期染色体標本を作製し、分裂間期染色体標本中で、染色体腕の幅を基準にして確認した。

【００７６】

図１および図２の横軸は培養雰囲気中の酸素濃度％（ｖ/ｖ）を示し、縦軸は増幅構造形成頻度（％）を示す。両図によれば、ＩＲおよびＭＡＲを備えたプラスミド（ｐΔＢＮＡＲ１、およびｐΔＢＮＴＲＥ）が導入された形質転換細胞を、低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合は、通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合に比して、明らかに増幅構造形成頻度が高くなっていることが示された。また低酸素濃度条件下で培養された細胞は、増幅構造が大型化する傾向が見られた（中型ＨＳＲまたは大型ＨＳＲが増加）。

【００７７】

なお、図１および２における「Ｌ」、「Ｍ」、および「Ｓ」は、「大型ＨＳＲ」、「中型ＨＳＲ」、および「小型ＨＳＲ」をそれぞれ示す（以下の実施例において同じ）。

【００７８】

〔実施例２〕

（方法）

TREプロモーターの下流に発現マーカーのd2EGFP構造遺伝子（以下「d2EGFP遺伝子」）を備え、且つＩＲおよびＭＡＲをもつプラスミド（pSFVdhfr/d2EGFP）、または、TREプロモーターおよびd2EGFP遺伝子を備え、ＩＲおよびＭＡＲを有しないプラスミド（pSFV-Vd2EGFP）をそれぞれTet-Onプラスミド（クロンテック社製）と共に、ＣＨＯ細胞にリポフェクションにより導入した。その後、形質転換体を５μg／ｍｌブラスティサイジンにより選抜した。ブラスティサイジンによる選抜の際に、培養雰囲気中の酸素濃度を、通常の２０％（ｖ/ｖ）、低酸素条件の１０％（ｖ/ｖ）、または低酸素条件の５％（ｖ/ｖ）にしてＣＨＯ細胞の培養を行なった。４週間培養後、細胞を固定し、プラスミドプローブを用いてＦＩＳＨを行なった。また４週間培養後、Doxycycline（クロンテック社製、以下「Dox」という）を１μg/mlになるように培地中へ添加することによって、タンパク質の発現を誘導し、セルソーターでd2EGFP（Green Fluorescent Protein）の発現量を定量した。セルソーターによるd2EGFP発現量の測定は、生細胞のみをゲートにかけ、２万個の細胞をソートすることによって行なわれた。なおセルソーターは、Becton Dickinson 社製を用い、運転条件は付属のマニュアルに従った。

【００７９】

pSFVdhfr/d2EGFPは、pSFVdhfrのヒグロマイシン抵抗性遺伝子発現ユニットを除去し、その位置にTREプロモーター（クロンテック社製）、d2EGFP遺伝子、SV40 poly A配列（pTRE-d2EGFP （クロンテック社製）由来）を、この順で、転写がIRの方向に向かうように組み込むことにより構築された。なお上記pSFVdhfr（11.0kbp）は、John Kolman 博士および Geoffrey M. Wahl 博士(The Salk Institute, San Diego, CA)から供与された。PSFVdhfrはヒドロ葉酸リダクターゼに対して3'-下流の領域に由来するOriβを含む4.6kbp断片を有している（「Dijkwel, P. A., and Hamlin, J. L. Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. Mol. Cell Biol., 8: 5398－5409, 1988.」参照）。

【００８０】

またpSFV-Vd2EGFPは、pSFVdhfrからDHFR IR部分をNot I消化により切り出し、一旦クローン化した後、Bam HIおよびNru I消化によりヒグロマイシン抵抗性遺伝子の発現カセットを除き、その位置にTREプロモーター（クロンテック社製）、d2EGFP遺伝子、SV40 poly A配列（pTRE-d2EGFP （クロンテック社製）由来）を、この順で、転写がBam HIがあった方向に向かうように組み込むことにより構築された。

【００８１】

（結果）

図３～図７は、pSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に関する結果を示しており、図３は遺伝子増幅構造形成頻度を示す図であり、図４は各形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量を示す図であり、図５は２０％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図であり（d2EGFP発現量＝２,８８２）、図６は１０％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図であり（d2EGFP発現量＝１０,８２５）、図７は５％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である（d2EGFP発現量＝３,４２２）。

【００８２】

図３によれば、ＩＲおよびＭＡＲを備えたプラスミド（pSFVdhfr/d2EGFP）が導入された形質転換細胞を、低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合は、通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合に比して増幅構造形成頻度が高くなる傾向が見られ、さらに低酸素濃度条件下で培養された細胞は、増幅構造が大型化していることが示された（大型ＨＳＲが増加していた）。また図４～７によれば、ＩＲおよびＭＡＲを備えたプラスミド（pSFVdhfr/d2EGFP）が導入された形質転換細胞を、低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合は、通常

の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合に比してd2EGFPの発現量が高くなっていることが示された。

【００８３】

また図８～図１２は、pSFV-Vd2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞に関する結果を示しており、図８は遺伝子増幅構造形成頻度を示す図であり、図９は各形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量を示す図であり、図１０は２０％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図であり（d2EGFP発現量＝１３６）、図１１は１０％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図であり（d2EGFP発現量＝１６５）、図１２は５％（ｖ/ｖ）の酸素条件で培養された形質転換細胞の多クローン性集団のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果を示す図である（d2EGFP発現量＝７４０）。

【００８４】

図８によれば、ＩＲおよびＭＡＲを有しないプラスミド（pSFV-Vd2EGFP）が導入された形質転換細胞を、低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合は、通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合に比して増幅構造形成頻度が高くなる傾向が見られ、さらに低酸素濃度条件下で培養された細胞は、増幅構造が大型化していることが示された（中型ＨＳＲが増加していた）。また図９～１２によれば、ＩＲおよびＭＡＲを備えたプラスミド（pSFVdhfr/d2EGFP）が導入された形質転換細胞を、低酸素濃度条件下（１０％（ｖ/ｖ）または５％（ｖ/ｖ））で培養した場合は、通常の酸素濃度条件（２０％（ｖ/ｖ））で培養した場合に比してd2EGFPの発現量が高くなることが示された。

【００８５】

〔実施例３〕

d2EGFP遺伝子の回文配列（Palindrome）をもつプラスミド（pΔBN.Palimd）を構築した。簡単には以下の通りとした。まずpSFVdhfr/d2EGFPをSac IIおよびBam HIで消化して得られたd2EGFP遺伝子をライゲーションすることによって、当該遺伝子の回文配列（Palindrome）の繰り返し構造を有する遺伝子構築物を得た。次に上記遺伝子構築物をBam HI消化することによって、d2EGFP遺伝子の回文配列（１単位）を調製した。得られたd2EGFP遺伝子の回分配列（１単位）を、pSFVdhfr/d2EGFPのSacIIおよびBam HI消化物にライゲーションして、ブラスティサイジン耐性遺伝子、IR、MAR、TREプロモーター、およびd2EGFP遺伝子の回文配列（１単位）を有するプラスミド（pΔBN.Palind）を構築した。当該pΔBN.Palindの模式図を図１３に示す。なおpΔBN.Palindにおいては、目的遺伝子はブラスティサイジン耐性遺伝子（図１３における「ＢＳＲ」）といえる。

【００８６】

d2EGFP遺伝子の回文配列を有するpΔBN.Palind、d2EGFP遺伝子の回文配列を有しないpSFVdhfr/d2EGFPをそれぞれTet-Onプラスミド（クロンテック社製）と共に、ＣＨＯ細胞にリポフェクションにより導入した（導入工程）。

【００８７】

遺伝子導入後の各細胞を、５μｇ／ｍｌブラスティサイジンを含む培地中で２週間培養することによって、安定な形質転換細胞の多クローン性集団を選抜した（選抜工程）。

【００８８】

選抜工程によって選抜された形質転換細胞の多クローン性集団を新鮮な培地に接種し、さらに２週間培養を行なった（培養工程）。

【００８９】

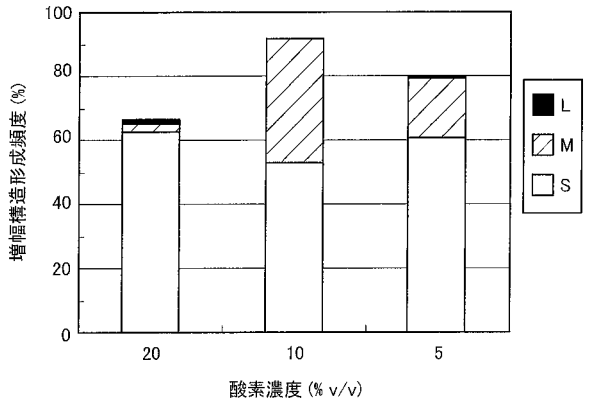
なお、以下に示すパターンにしたがって、Doxを１μｇ／ｍｌとなるように培地中へ添加した。

（I）導入工程、選抜工程および培養工程の全工程においてDoxが系内に添加されている。

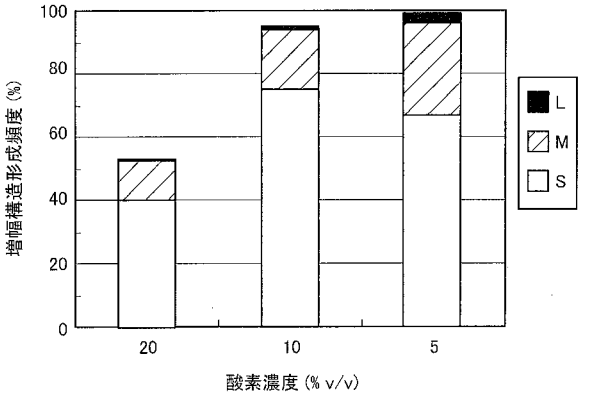
（II）導入工程および選抜工程においてDoxが系内に添加されている。培養工程においてDoxが培地に添加されていない。

（III）導入工程および選抜工程においてDoxが系内に添加されていない。培養工程の２週間においてDoxが培地に添加されている。
（IV）導入工程および選抜工程においてDoxが系内に添加されていない。培養工程の後半１週間のみにおいてDoxが培地に添加されている。
（V）導入工程および選抜工程においてDoxが系内に添加されていない。培養工程の最後の１日のみにおいてDoxが培地に添加されている。
【００９０】
上記各工程を経た形質転換細胞を固定し、プラスミドプローブを用いてＦＩＳＨを行なった。また上記細胞について、セルソーターでd2EGFPの発現量を定量した。
【００９１】
（結果）
図１４にpΔBN.Palindが導入されたＣＨＯ細胞の増幅構造形成頻度の結果を示し、図１５にpSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞の増幅構造形成頻度の結果を示した。各図の横軸は(I)～（V）は、上記Doxの添加パターン(I)～（V）にそれぞれ対応している。図１４と図１５とを比較すれば、pΔBN.Palindが導入されたＣＨＯ細胞の増幅構造形成頻度の方が、pSFVdhfr/d2EGFPの場合のそれに比して明らかに高いということが分かる。すなわち上記結果は、回文配列を導入することによって遺伝子増幅効率が増加したことを示している。
【００９２】
また図１４および１５の結果によれば、(I)および(II)のパターンに比して、（III）、(IV)および(V)のパターンでDoxを添加した細胞の方が、増幅構造形成頻度が高くなる傾向にあり、さらに増幅構造が大型化していることが示された（中型ＨＳＲおよび大型ＨＳＲが増加していた）。すなわちこの結果は、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なうことによって、遺伝子の増幅効率が向上したことを示している。
【００９３】
図１６～２１にpSFVdhfr/d2EGFPが導入されたＣＨＯ細胞のd2EGFP発現量を示した。図１６は、(I)～(V)のDox添加パターンにおける、d2EGFP発現量を示す棒グラフであり、図１７～２１は、(I)～(V)のパターンのパターンでDoxが添加された場合のd2EGFP発現量をセルソーターにより解析した結果をそれぞれ示す（（I）のd2EGFP発現量＝６８６、（II）のd2EGFP発現量＝１,００３、（III）のd2EGFP発現量＝３，２７７、（IV）のd2EGFP発現量＝３，４５９、（V）のd2EGFP発現量＝３，０２０）。
【００９４】
図１６～２１によれば、d2EGFPの発現量についても、(I)および(II)のパターンに比して、（III）、(IV)および(V)のパターンでDoxを添加した細胞の方が、高くなることが示された。すなわちこの結果は、転写活性調節型プロモーターの転写活性が不活性化された状態で導入工程および選抜工程を行なうことによって、遺伝子の増幅効率が向上し、最終的にd2EGFPが高発現したことを示している。
【産業上の利用可能性】
【００９５】
上記説示したように本発明にかかる方法によれば、高度遺伝子増幅系を用いて、または当該高度遺伝子増幅系を用いることなく目的遺伝子を増幅する際に、遺伝子増幅効率を増加させることが可能となる。それゆえ本発明によれば、所望のタンパク質（例えば有用タンパク質）を大量に生産することができるという効果を奏する。
【００９６】
したがって本発明は、タンパク質の生産を行なう産業、例えば医薬品、化学、食品、化粧品、繊維等種々広範な産業において利用可能である。

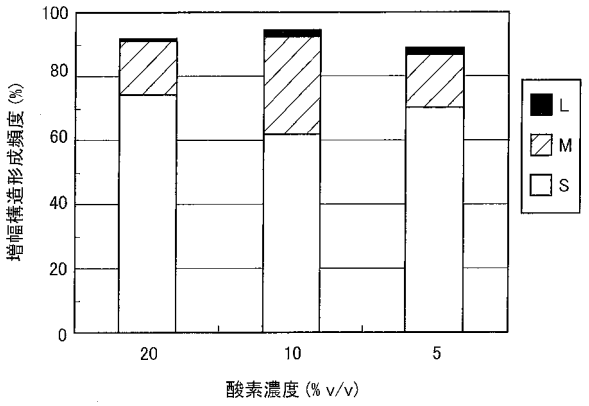
【図１】



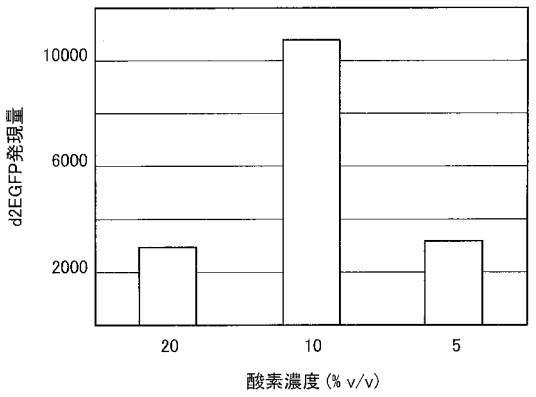
【図２】



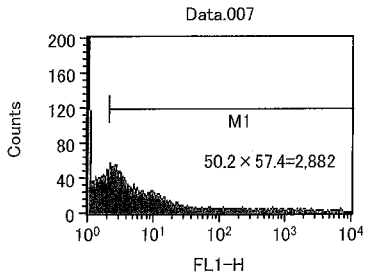
【図３】



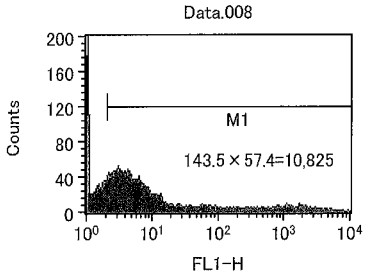
【図４】



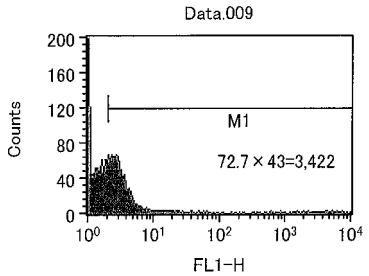
【図５】



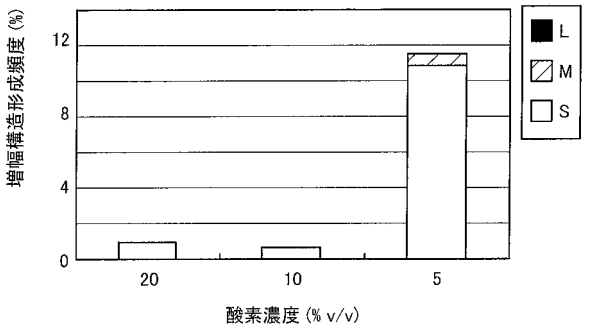
【図６】



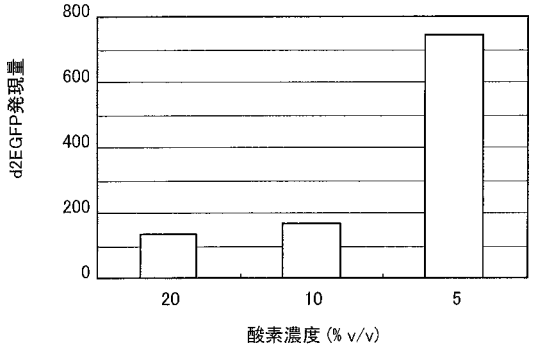
【図７】



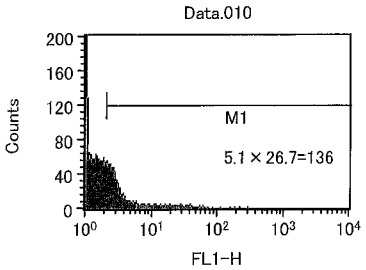
【図８】



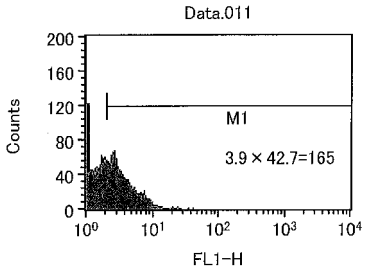
【図９】



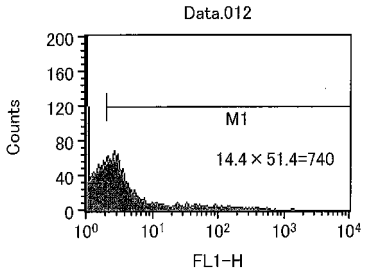
【図１０】



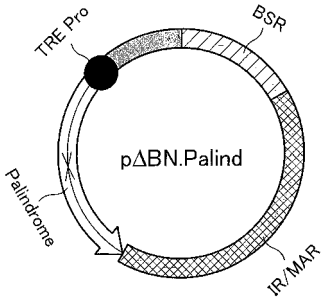
【図１１】



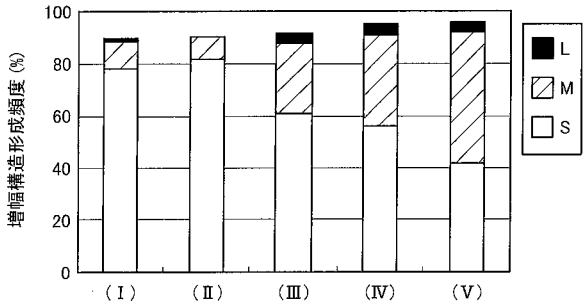
【図１２】



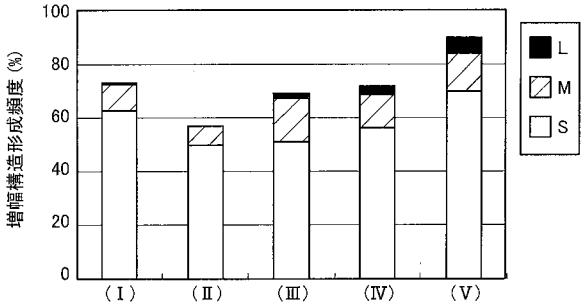
【図１３】



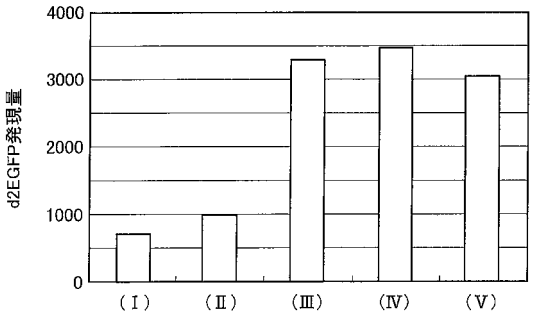
【図１４】



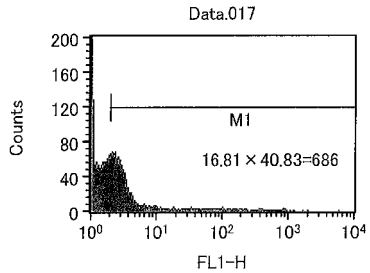
【図１５】



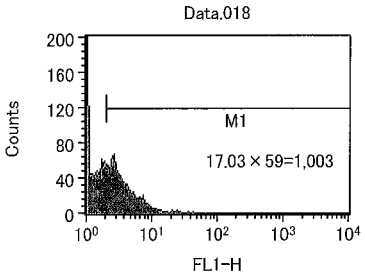
【図１６】



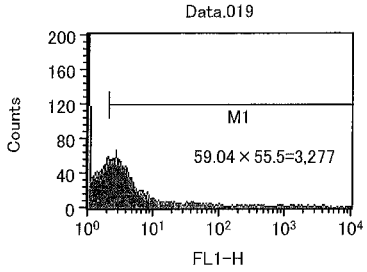
【図１７】



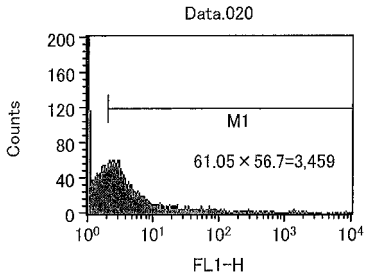
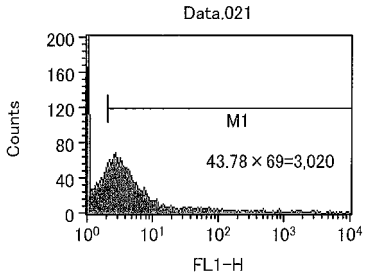
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【図２１】