

(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2015-112086

(P2015-112086A)

(43) 公開日 平成27年6月22日(2015.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2013-258265 (P2013-258265)</p> <p>(22) 出願日 平成25年12月13日(2013.12.13)</p> <p>(出願人による申告)平成23年度、独立行政法人科学技術振興機構、研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(71) 出願人 304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田1677-1</p> <p>(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀</p> <p>(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次</p> <p>(74) 代理人 100096482 弁理士 東海 裕作</p> <p>(74) 代理人 100188352 弁理士 松田 一弘</p> <p>(74) 代理人 100131093 弁理士 堀内 真</p> <p>(74) 代理人 100150902 弁理士 山内 正子</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換細胞の製造方法

(57) 【要約】

【課題】プロモータ配列とRNA発現用DNA配列を予め連結することなく、細胞内で目的とするRNAを発現可能な形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造する方法を提供すること。

【解決手段】プロモータ配列を有する線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAとを細胞内に導入することで、細胞内で目的とするRNAを発現する形質転換細胞を製造する。かかる製造方法により、目的とするRNAを発現する形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロモータ配列からなる線状二本鎖 DNA、及び、RNA 発現用 DNA 配列とターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA を細胞内に導入し、前記 RNA 発現用 DNA 配列由来の RNA を発現させることを特徴とする形質転換細胞の製造方法。

【請求項 2】

細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の形質転換細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、形質転換細胞の製造方法に関し、より詳しくは、プロモータ配列からなる線状二本鎖 DNA、及び、RNA 発現用 DNA 配列とターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA を細胞内に導入し、前記 RNA 発現用 DNA 配列由来の RNA を発現させる形質転換細胞の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

20

形質転換細胞を作製して該細胞内で目的遺伝子などを発現させるには、プロモータ配列と目的遺伝子配列とターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA を作製し、かかる DNA コンストラクトを、ベクターを介して細胞に導入する方法が一般的である。この方法を用いる場合には、プロモータ配列と目的遺伝子配列とターミナー配列とを順次備えるように DNA を連結する必要がある。現在、DNA を連結するために最も一般的に用いられている手法は、DNA リガーゼを用いて、平滑末端を有する DNA 分子同士又は相補的な突出末端を有する DNA 分子同士を結合させるものである。

【0003】

30

この手法を応用した形質転換細胞の作製方法として、Cohen - Boyer 法（非特許文献 1 参照）が知られており、この方法では、インサート DNA とベクターとをそれぞれ制限酵素で切断して精製した後に DNA リガーゼによって連結して目的のコンストラクトを作製し、該コンストラクトにより大腸菌を形質転換している。しかし、Cohen - Boyer 法においては、形質転換用のコンストラクトを作製するために制限酵素と DNA リガーゼによる DNA の連結という煩雑な *in vitro* 操作を必要とし、さらに、形質転換後の大腸菌コロニーの中から目的のコンストラクトを含む大腸菌を選択するために多くの時間が必要とされていた。

【0004】

40

Cohen - Boyer 法に代わる、制限酵素や DNA リガーゼを使用しない形質転換細胞の作製方法として、*in vitro* 相同組換え法や、*in vivo* 相同組換え法が開発されている。上記 *in vitro* 相同組換え法は、特定の組換え酵素と該酵素の認識配列を使用することにより DNA 分子をつなぎ合わせるものであり、Invitrogen 社の Gateway 法や、タカラバイオ社の In - Fusion クローニング法などが知られている。しかし、これらの方法は、予め用意した線状化ベクターとインサート DNA を上記特定の酵素で結合する点で本質的には Cohen - Boyer 法と大差なく、線状化ベクターの調製や大腸菌内での環状化が必要であり、さらにインサート DNA の両端及びベクターに特定の DNA 配列が存在する必要があった。

【0005】

50

一方、前述のような DNA コンストラクトを、ベクターを介さずに細胞に導入して形質転換細胞を作製する方法として、プロモータ配列、目的遺伝子配列、発現マーカー及びポリアデニレーションシグナル配列から構成される DNA 断片を環状化して動物細胞に導入する方法が提案されている（特許文献 1 参照）。この特許文献 1 記載の方法を用いれば、ベクターを介さずに形質転換細胞を作製して細胞内で目的とする遺伝子を発現させることが可能となるが、各配列（プロモータ配列、目的遺伝子配列、発現マーカー、ポリアデニレーションシグナル配列）の両端に制限酵素サイト或いはアニーリング配列をそれぞれ組

み込み、PCRにより上記DNA断片を構築し、次いでその5'末端へのリン酸の付加、若しくは制限酵素により突出末端を作製してセルフライゲーションによる環状化を行う必要があった。

【0006】

近年、本発明者らは、同じくベクターを介さずに形質転換細胞を作製する方法として、特定のターミネータ配列を含む高発現用リバースプライマーを用いて作製した、プロモータ配列、目的RNA発現用DNA配列、特定ターミネータ配列を順次備えた線状二本鎖DNAを動物細胞に導入する方法を提案した(特許文献2参照)。この特許文献2の方法では、制限酵素サイトやアニーリング配列を導入することなく、また煩雑な環状化操作を行うこともなく、PCRのみによってターミネータ配列をRNA発現用DNA配列の下流に連結でき、得られた線状二本鎖DNAを動物細胞に導入することで形質転換細胞を得ることが可能となるが、PCRを行う際は、プロモータ配列と目的RNA発現用DNA配列とを順次備えたテンプレートを予め用意する必要があるため、テンプレートがない場合やプロモータ配列を変える場合にはまだ改良されるべき点があった。

10

【0007】

また、本発明者らは、自律複製配列を含まない2種以上の線状二本鎖DNAをクルイペロマイセス・マルシアヌスに導入し、該2種以上の線状二本鎖DNAからなるDNA連結体により発現するマーカー遺伝子の発現を指標として所望のDNA連結体を含む形質転換体を選択する形質転換酵母の製造方法を提案した(特許文献3参照)。この特許文献3の方法では、プロモータ配列とマーカーをコードする遺伝子の上流配列を順次備えた線状二本鎖DNAと、マーカーをコードする遺伝子の上流配列を欠損した配列と所望の有用物質をコードする配列を順次備えた線状二本鎖DNAとをクルイペロマイセス・マルシアヌスに導入することで、2つの線状二本鎖DNAをクルイペロマイセス・マルシアヌス内で連結させてマーカー遺伝子を発現させている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2004-141025号公報

【特許文献2】国際公開第2012/147370号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2011/114613号パンフレット

30

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Cohen SN et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3240-3244 (1973)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、プロモータ配列とRNA発現用DNA配列を予め連結することなく、細胞内で目的とするRNAを発現可能な形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造する方法を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく鋭意検討を行った中で、様々な2つの線状二本鎖DNAを作製して哺乳動物細胞に導入したところ、意外にも、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、タンパク質をコードする遺伝子配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入した場合において、細胞内で目的とするタンパク質が発現していることを見だし、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は、[1]プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入し

50

、前記RNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させることを特徴とする形質転換細胞の製造方法や、[2]細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする上記[1]記載の形質転換細胞の製造方法に関する。

【発明の効果】

【0013】

本発明によると、細胞内で遺伝子などを発現させる場合や、プロモータアッセイを行う場合や、プロモータ配列中の発現制御に関わる配列を解析する場合に、プロモータ配列と遺伝子などをコードする配列とを連結する工程や、プラスミドを作製する工程が不要となる。特に、マイクロアレイや次世代シーケンサーによるmRNAの網羅的な解析において、レポーター遺伝子を用いたプロモータ活性の検出によってmRNAの発現量を調べる場合、本発明を利用することで短時間且つ低コストでプロモータ活性の検出が可能となる点で有用である。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】CMVプロモータ配列からなる線状二本鎖DNA(CMVp)、分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(Gluc-Svter)、CMVp及びGluc-Svter(CMVp+Gluc-Svter)、CMVプロモータ配列と分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(CMVp-Gluc-Svter)のそれぞれをヒト胎児腎細胞(HEK293細胞)に導入してルシフェラーゼ発現量を調べた結果を示す図である。横軸は導入した線状二本鎖DNA、縦軸は分泌型ルシフェラーゼ活性(counts/sec/μl)を示す。

20

【図2】CMVp、Gluc-Svter、CMVp+Gluc-Svter、CMVp-Gluc-Svterのそれぞれをヒト子宮頸部類上皮腫細胞(HeLa細胞)に導入してルシフェラーゼ発現量を調べた結果を示す図である。横軸は導入した線状二本鎖DNA、縦軸は分泌型ルシフェラーゼ活性(counts/sec/μl)を示す。

【図3】CMVp、Gluc-Svter、CMVp+Gluc-Svter、CMVp-Gluc-Svterのそれぞれをアフリカミドリザル腎臓由来細胞(COS-7細胞)に導入してルシフェラーゼ発現量を調べた結果を示す図である。横軸は導入した線状二本鎖DNA、縦軸は分泌型ルシフェラーゼ活性(counts/sec/μl)を示す。

30

【図4】左から順に、CMVプロモータ配列の3'末端領域の60塩基のみの配列とGFP遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(CMVp-60-EGFP-Svter)、CMVp及びCMVp-60-EGFP-Svter(CMVp+CMVp-60-EGFP-Svter)、CMVプロモータ配列とGFP遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列を順次備えた線状二本鎖DNA(CMVp-EGFP-Svter)をそれぞれHEK293細胞に導入し、48時間後に蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の形質転換細胞の製造方法としては、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入し、前記RNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる形質転換細胞の製造方法であればよく、かかる形質転換細胞の製造方法により、プロモータ配列と遺伝子などをコードする配列とを予め連結することなく、細胞内でRNA発現用DNA配列のRNAを発現させることが可能となる。

40

【0016】

本発明において、プロモータ配列としては、RNAの発現を行う目的、RNAを発現させる哺乳動物などの細胞の種類、RNA発現用DNA配列の種類、ターミネータ配列の種類などにより適宜選択することができるが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモータ配列、ヒト伸長因子1(EF1)プロモータ配列、シミアンウイルス(SV40

50

）プロモータ配列、アデノウイルス後期（Adenovirus Major Late、A M L）のA M Lプロモータ配列、S V 4 0及びH T L V - 1 L T Rの融合プロモータであるS R プロモータ配列、ヒトユビキチンCプロモータ配列、 α -アクチンプロモータ配列、 β -アクチンプロモータ配列、U 6プロモータ配列、H 1プロモータ配列、テトラサイクリンによってRNA発現が抑制されるT e t - O f fプロモータ配列、テトラサイクリンによってRNA発現が誘導されるT e t - O nプロモータ配列、亜鉛などの金属や種々の刺激により誘導されるメタロチオネインプロモータ配列、活性酸素により誘導されるA R Eプロモータ配列を例示することができ、ヒトサイトメガロウイルス（C M V）プロモータ配列をより好適に例示することができる。

【0017】

本発明において、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNAには、プロモータ配列のみからなる線状二本鎖DNAの他、形質転換細胞においてRNA発現用DNA配列のRNAを発現しうる限り、プロモータの部分配列からなる線状二本鎖DNAや、プロモータ配列に塩基の置換、欠損、又は挿入を含む線状二本鎖DNAや、プロモータ配列の上流（5'末端側）又は下流（3'末端側）に任意の塩基が連結した線状二本鎖DNAも便宜上含まれるが、プロモータ配列のみからなる線状二本鎖DNAを好適に例示することができる。また、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNAの長さ（塩基）としては、30～1000塩基、好ましくは100～2000塩基、より好ましくは200～1500塩基を例示することができる。

【0018】

本発明において、RNA発現用DNA配列としては、RNAを発現しうる線状二本鎖DNA配列であればよく、タンパク質をコードする遺伝子配列の他、shRNA（small hairpin RNA）発現配列、siRNA（short interfering RNA）発現配列、miRNA（micro-RNA）、核酸アプタマー発現配列、デゴイ発現配列、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現配列、リボザイム発現配列などの機能性核酸を発現するDNA配列を例示することができる。そして、RNA発現用DNA配列がタンパク質をコードする遺伝子配列の場合、RNAの発現はタンパク質の発現と言い換えることができる。

【0019】

本発明によって製造された形質転換細胞により細胞内でタンパク質を発現させる場合は、RNA発現用DNA配列として、タンパク質をコードする遺伝子配列を選択でき、タンパク質をコードする遺伝子配列としては、用途に合わせて全長の遺伝子配列でも、その一部でもよい。また、その由来はいかなる生物から単離された遺伝子でも、遺伝子工学的に作製された人工的な遺伝子でもよく、遺伝子における5'末端の開始コドン及び3'末端の停止コドンは、適宜、含んでも含まなくてもよい。

【0020】

本発明によって製造された形質転換細胞により細胞内のタンパク質の発現をロックダウンする場合、RNA発現用DNA配列としては、タンパク質をコードする遺伝子のmRNAの発現を抑制できるshRNA発現用DNA配列や、siRNA発現用DNA配列や、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現用DNA配列を選択することができ、本発明によって製造された形質転換細胞により細胞内のタンパク質の活性化作用を阻害又は抑制する場合は、RNA発現用DNA配列として、タンパク質の活性化作用を阻害又は抑制できる核酸アプタマー発現用DNA配列や、リボザイム発現用DNA配列を選択することができ、上記配列は、それぞれ標的RNAの配列や、その転写因子が結合し得る配列の情報に基づいて常法により設計することができる。

【0021】

本発明において、ターミネータ配列としては、RNAの発現を行う目的、RNA発現を行う細胞の種類、プロモータの種類、RNA発現用DNA配列の種類などによって適宜選択することができ、天然に存在するターミネータ配列であっても、データベース上の配列に基づいて人工的に合成したターミネータ配列であってもよい。人工的に合成したターミ

10

20

30

40

50

ネータ配列を用いる場合、RNAの発現量を高める観点から、好ましくは長さ40～250塩基、より好ましくは40～200塩基、さらに好ましくは60～120塩基、中でも70～120塩基からなり、1番目の塩基がA（アデニン）、T（チミン）、又はG（グアニン）であり、2番目の塩基がA、T、又はGであり、3番目の塩基がTであり、4番目の塩基がAであり、5番目の塩基がAであり、6番目の塩基がAであり、7番目の塩基がA、T、G、又はC（シトシン）であり、8番目の塩基がA、T、G、又はCであり、9番目の塩基がA、G、又はCである、(A/T/G)、(A/T/G)、T、A、A、A、(A/T/G/C)、(A/T/G/C)、(A/G/C)の連続した9塩基の配列を含むターミネータ配列を好適に例示することができ、A、(A/T)、T、A、A、A、(A/T/G)、(A/G/C)、(A/C)の連続した9塩基の配列を含むターミネータ配列をより好適に例示することができ、かかる連続した9塩基が1又は2以上含まれていてもよい。

10

【0022】

このようなターミネータ配列としては、例えば、前述の特許文献2に記載された配列などの当業者に公知の配列が挙げられるが、ラビット - グロビン (- globin) ターミネータ配列又はシミアンウイルス40 (SV40) ターミネータ配列の一部であって上記の長さ及び配列を有するものを好ましく挙げる事ができ、この中から適宜選択することが好ましい。例えば、ラビット - グロビナーミネータ配列 (配列番号1) の塩基配列における塩基番号121～190番目、121～180番目、121～200番目、121～220番目、130～190番目の各塩基配列や、SV40ターミネータ配列 (配列番号2) の塩基配列における塩基番号130～208番目、121～220番目、130～220番目の各塩基配列をより好ましく挙げる事ができる。

20

【0023】

また、天然に存在するターミネータ配列を用いる場合、本発明のターミネータ配列としては、ウィルスのターミネータ配列であっても、大腸菌、枯草菌などの原核生物のターミネータ配列であっても、酵母、マウス、ヒトなどの真核生物のターミネータ配列であってもよく、具体的には、ラビット - グロビン (- globin) ターミネータ配列、シミアンウイルス40 (SV40) ターミネータ配列、ウシ成長ホルモン (BGH) ターミネータ配列、HSV・TKターミネータ配列、CYC1ターミネータ配列、ADHターミネータ配列、SPAターミネータ配列、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼ (NOS) 遺伝子ターミネータ配列、カリフラワー・モザイク・ウイルス (CaMV) 35S遺伝子のターミネータ配列、トウモロコシ由来のZein遺伝子ターミネータ配列、ルビスコ小サブユニット (SSU) 遺伝子ターミネータ配列、サブクロバー・スタント・ウイルス (SCSV) 遺伝子ターミネータ配列、LacZアルファターミネータ配列、polyTターミネータ配列などを例示することができ、RNAの発現量を高める観点からは、好ましくはシミアンウイルス40 (SV40) ターミネータ配列を例示することができる。

30

【0024】

本発明において、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを導入する細胞としては、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などを例示することができ、中でも哺乳動物細胞を好適に例示することができる。かかる哺乳動物細胞としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、イヌなどの哺乳動物由来の細胞であればよく、具体的にはHEK293細胞、HeLa細胞、COS-7細胞、NIH由来のマウス胎仔由来繊維芽細胞 (NIH-3T3細胞)、ヒト骨肉腫細胞 (HOS細胞)、培養ヒト骨芽細胞 (SaM-1細胞)、ヒト白血球T細胞 (jurkat細胞)、ヒト乳癌培養樹立細胞 (MCF-7細胞)、ヒト肝臓ガン由来細胞 (HepG2細胞)、ヒト結腸癌由来細胞 (CaCO-2細胞)、ヒト骨芽細胞 (SaOS細胞)、ヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562細胞)、サル腎由来細胞 (CV-1細胞)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (COS-1細胞)、マウス由来繊維芽細胞 (L929細胞)、マウス奇形腫細胞 (F9

40

50

細胞)、マウス骨芽様細胞(MC-3T3-E1細胞)、ラット副腎髄質褐色腫(PC-12細胞)、ラット骨芽細胞様細胞(ROS17/2.8細胞)、チャニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO-K1細胞)、ハムスター腎細胞(BHK-21細胞)などを例示することができ、中でもHEK293細胞、HeLa細胞、COS-7細胞、NIH-3T3細胞が好ましい。また、上記哺乳動物細胞には、株化Bリンパ芽球(EB3細胞)などの胚性幹細胞(ES細胞)や、組織から採取した初代培養細胞も含まれる。

【0025】

本発明のRNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAとしては、RNA発現用DNA配列の下流(3'末端側)にターミネータ配列が動作可能に連結された線状二本鎖DNAであればよく、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列の間、又はターミネータ配列の下流にいかなる構成因子を含んでもよく、例えば、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列の間にはシグナルペプチド又はタグペプチドをコードする配列を含んでもよく、ターミネータ配列の下流にはタグペプチドをコードする配列を含んでもよい。シグナルペプチドとしては、ゴルジ体移行シグナルペプチド、細胞膜移行シグナルペプチド、ミトコンドリア移行シグナルペプチド、核移行シグナルペプチド、シナプス移行シグナルペプチド、核小体移行シグナルペプチド、核膜移行シグナルペプチド、ペルオキシソーム移行シグナルペプチドなどを好適に例示することができ、タグペプチドとしては、FLAGタグペプチド、HAタグペプチド、MYCタグペプチド、GFPタグペプチド、MBPタグペプチド、GSTタグペプチド、HISタグ、SNAPタグ、ACPタグ、CLIPタグ、TAPタグ、V5タグなどを好適に例示することができる。

10

20

【0026】

また、RNA発現用DNA配列の上流には、プロモータ配列の3'末端領域の一部の配列からなる配列を備えてもよく、かかる配列の長さとしては、1~200塩基を例示することができ、1~80塩基を好適に例示することができ、1~60塩基をより好適に例示することができる。

【0027】

RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを作製する方法としては特に制限されないが、例えば、前述の特許文献2に記載された当業者に公知のターミネータ配列を含む高発現用リバースプライマーを用いて作製する方法や、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとしてPCR法で作製する方法や、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列をフュージョンPCR法(特開2009-268360号公報)で連結して作製する方法を例示することができる。ターミネータ配列を含む高発現用リバースプライマーを用いる方法としては、RNA発現用DNA配列をテンプレートとして、RNA発現用DNA配列の5'末端領域の配列からなるフォワードプライマーと、前述のターミネータ配列とRNA発現用DNA配列の3'末端領域の配列とを順次含むDNA配列の相補配列からなるリバースプライマーを用いてPCRを行う方法を例示することができる。また、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとしてPCR法で作製する方法としては、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを含む線状若しくは環状の二本鎖DNAをテンプレートとして、RNA発現用DNA配列の5'末端領域の配列からなるフォワードプライマーと、ターミネータ配列の3'末端領域の相補配列からなるリバースプライマーを用いてPCRを行う方法を例示することができる。

30

40

【0028】

プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入する方法としては、DNAを哺乳動物などの細胞内に導入する一般的な方法であればよく、リボソーム法、リボフェクション法、マイクロインジェクション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などを例示することができ、Lipofectin Reag

50

ent (登録商標)、Lipofectamine (登録商標)、Lipofectamine (登録商標) 2000 Reagent (インビトロジェン社製)、SuperFect (登録商標) Transfection Reagent (キアゲン社製)、FuGENE (登録商標) HD Transfection Reagent、FuGENE (登録商標) Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)などの市販のトランスフェクション試薬並びに当技術分野で広く用いられている手法を用いることができる。

【0029】

また、細胞内に導入するプロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次有する線状二本鎖DNAは、同時に細胞に導入してもよく、いずれか一方を先に細胞に導入し、その後、他方を前記細胞に導入してもよいが、同時に細胞内に導入することが好ましい。プロモータ配列からなる線状二本鎖DNAと、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次有する線状二本鎖DNAの濃度は、形質転換細胞においてRNA発現用DNA配列のRNAを発現しうる限り特に制限されないが、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNAの濃度に対してRNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次有する線状二本鎖DNAの濃度が0.2~5倍、好ましくは0.5~2倍であることを例示することができる。

【実施例1】

【0030】

(CMVプロモータ配列からなる線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1 (クロンテック社製)をテンプレートとして、配列番号3 (pEGFP-60)に示されるフォワードプライマーと、配列番号4 (CMVpc)に示されるリバープライマーを用いてPCRを行い、CMVプロモータ配列からなる線状二本鎖DNA (CMVp)を作製した。PCR反応はGXLポリメラーゼ (タカラバイオ社製)を用いてその推奨プロトコルに準じて行った。それぞれの最終濃度は、テンプレート100pg/μl、フォワードプライマー0.3μM、リバープライマー0.3μMに調製し、icyclerサーマルサイクラー (BIO-RAD社製)を用いて98 10秒、60 15秒、68 2分のサイクルを30回行った。

【0031】

(分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pCMV-Gluc (ニュー・イングランド・バイオラボ社製)をテンプレートとして、配列番号5 (NotI-hGluc+2529)に示されるフォワードプライマーと、配列番号6 (pCMV-Gluc+1160c)に示されるリバープライマーを用いてPCRを行い、得られた線状二本鎖DNAを制限酵素NotIで消化してセルフライゲーションを行い、CMVプロモータと分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えたプラスミドDNA (pCMV-Gluc-Svter)を作製した。次に、作製したpCMV-Gluc-Svterをテンプレートとして、配列番号7 (hGluc+1)に示されるフォワードプライマーと、配列番号8 (pEGFP+1018c)に示されるリバープライマーを用いてPCRを行い、分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA (Gluc-Svter)を作製した。PCRの反応条件は、前述のCMVpを作製した場合と同様である。

【0032】

(CMVプロモータ配列と分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA作製)

前述のとおり作製したpCMV-Gluc-Svterをテンプレートとして、配列番号3 (pEGFP-600)に示されるフォワードプライマーと、配列番号8 (pEGFP+1018c)に示されるリバープライマーを用いてPCRを行い、CMVプロモータ配列と分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA (CMVp-Gluc-Svter)を作製した。PCRの反応条件は、上記CM

10

20

30

40

50

Vpを作製した場合と同様である。

【0033】

(細胞への導入及びルシフェラーゼ活性の測定)

HEK293細胞、HeLa細胞、COS-7細胞を2000細胞/wellになるように96wellプレートにそれぞれ播種して18時間培養後、上記で得られたCMVp20ng及びGluc-Svter各20ng(合計40ng)、CMVp20ng、Gluc-Svter20ng、CMVp-Gluc-Svter20ngをそれぞれ、FuGENE(登録商標)HD Transfection Reagentキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)により各細胞に導入し、24時間後に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼをBioLux Gausia Luciferase assay kit(ニュー・イングランド・バイオラボ社製)とCentro LB960(ベルトールド社製)を用いて測定した。HEK293細胞に導入した結果を図1に、HeLa細胞に導入した結果を図2に、COS-7細胞に導入した結果を図3に示す。

10

【0034】

(結果)

図1~3に示すように、いずれの細胞においても、CMVプロモータ配列からなる線状二本鎖DNA(CMVp)のみや、分泌型ルシフェラーゼをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列をと順次備えた線状二本鎖DNA(Gluc-Svter)のみを導入した場合にはルシフェラーゼの活性が殆ど検出されなかったが、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA及び分泌型ルシフェラーゼ遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列をと順次備えたDNA(CMVp+Gluc-Svter)を細胞に導入した場合には、いずれの細胞に導入した場合においても、ルシフェラーゼの活性が検出され、細胞内でルシフェラーゼが発現していることが明らかとなった。上記結果により、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、タンパク質をコードする遺伝子配列とターミネータ配列をと順次備えた線状二本鎖DNAとをそれぞれ細胞内に導入するだけで、細胞内でタンパク質を発現する形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造できることが明らかとなった。

20

【実施例2】

【0035】

(CMVプロモータ配列からなる線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック社製)をテンプレートとして、配列番号3(pEGFP-600)に示されるフォワードプライマーと、配列番号4(CMVpc)に示されるリバースプライマーを用いて実施例1と同様にPCRを行い、CMVpを作製した。

30

【0036】

(CMVプロモータ配列の一部の配列とGFPをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列を順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック社製)をテンプレートとして、配列番号9(pEGFP-600)に示されるフォワードプライマーと、配列番号8(pEGFP+1018c)に示されるリバースプライマーを用いてPCRを行い、CMVプロモータ配列の3'末端領域の60塩基のみの配列とGFP遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列をと順次備えた線状二本鎖DNA(CMVp-60-EGFP-Svter)を作製した。PCRの反応条件は、実施例1と同様である。なお、CMVプロモータ配列の3'末端領域の60塩基のみの配列だけでは、プロモータとしての機能を有しないことが知られている。

40

【0037】

(CMVプロモータ配列とGFPをコードする遺伝子配列とSV40ターミネータ配列を順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック社製)をテンプレートとして、配列番号3(pEGFP-600)に示されるフォワードプライマーと、配列番号8(pEGFP+1018c)に示されるリバースプライマーを用いてPCRを行い、CMVプロモータ配列とGFP遺伝子をコードする配

50

列とSV40ターミナータ配列を順次備えた線状二本鎖DNA (CMVp - EGFP - Svter) を作製した。PCRの反応条件は、実施例1と同様である。

【0038】

(細胞への導入及びルシフェラーゼ発現の測定)

上記で得られたCMVp 50ng及びCMVp - 60 - EGFP - Svter各50ng (合計100ng)、CMVp - 60 - EGFP - Svter 50ng、CMVp - EGFP - Svter 50ngをそれぞれFuGENE (登録商標) HD Transfection Reagentキット (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を用いて各HEK293細胞に導入し、48時間後に蛍光顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。

【0039】

(結果)

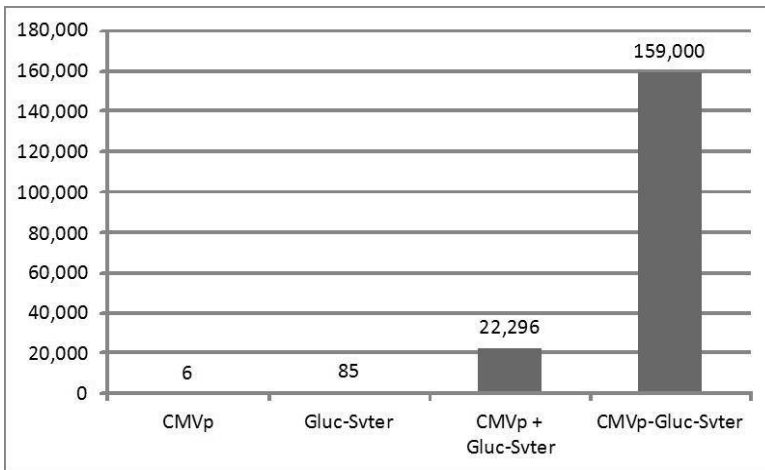
図4に示すように、CMVp - 60 - EGFP - Svterを導入した細胞では蛍光が観察されなかったが、CMVp及びCMVp - 60 - EGFP - Svterを導入した細胞では蛍光が観察された。上記結果から、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、タンパク質をコードする遺伝子配列とターミナータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAをそれぞれ細胞に導入するだけで、細胞内でタンパク質を発現する形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造できることが明らかとなった。また、タンパク質をコードする遺伝子配列とターミナータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの上流に60塩基の配列を有していても、細胞内でタンパク質が発現することが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

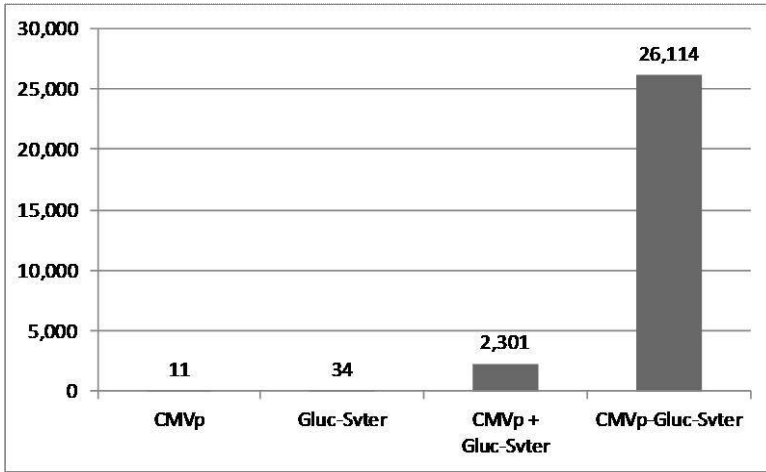
【0040】

本発明の形質転換細胞の製造方法は、目的とするRNAを発現する形質転換細胞を短時間かつ簡潔に製造することができるものであり、細胞内で遺伝子などを発現させる場合や、プロモータアッセイを行う場合や、プロモータ配列中の発現制御に関わる配列を解析する場合において産業上の有用性は高い。

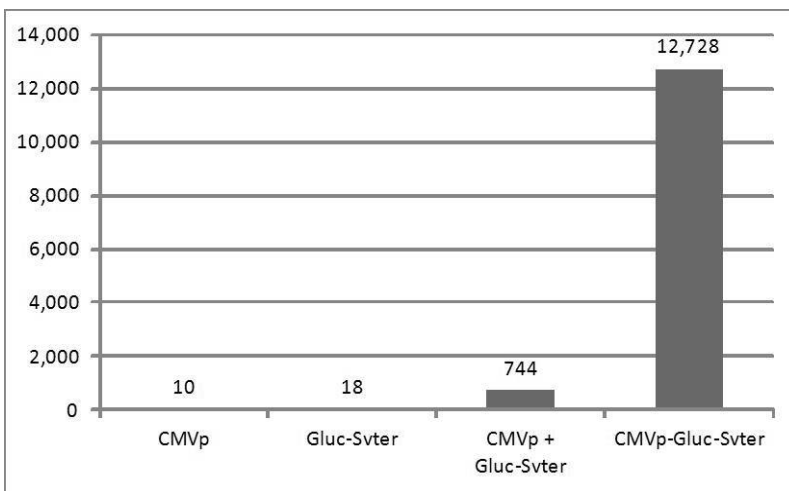
【図1】



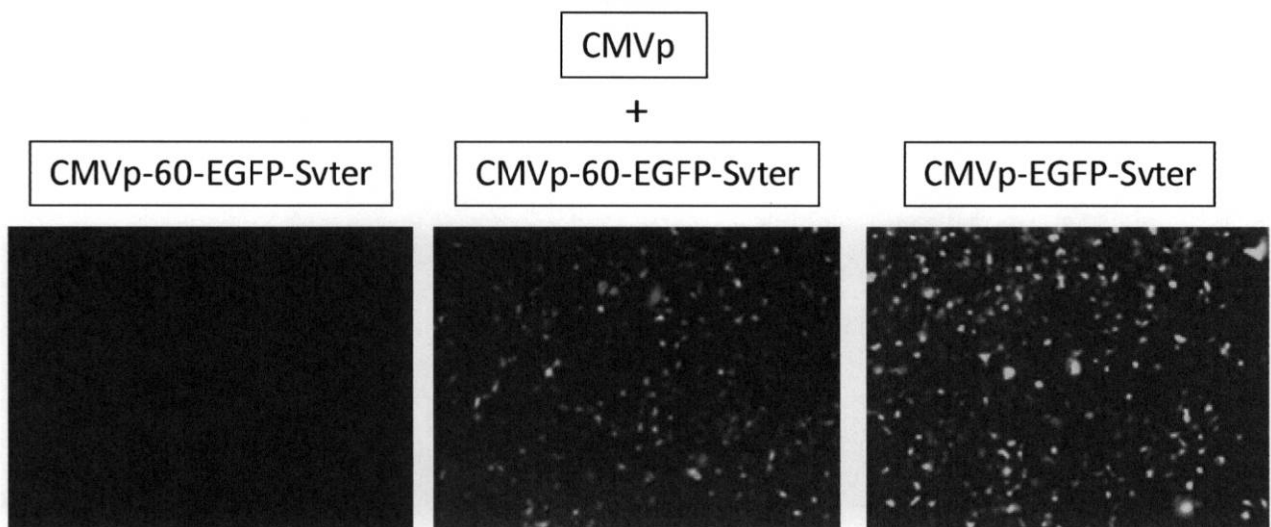
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2015112086000001.app](#)

フロントページの続き

(74)代理人 100177714

弁理士 藤本 昌平

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(72)発明者 中村 美紀子

山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

(72)発明者 赤田 倫治

山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

(72)発明者 星田 尚司

山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 FA02 GA11 HA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01