

(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2016-127817

(P2016-127817A)

(43) 公開日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 Z N A A	4B024
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1 O 2	4B064
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	4B065

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2015-3690(P2015-3690)
 (22) 出願日 平成27年1月9日(2015.1.9)

特許法第30条第2項適用申請有り ・ウェブサイトのアドレス <https://confit.atlas.jp/guide/event/mbsj2014/subject/2P-0928/advanced>
 掲載日 平成26年11月7日 ・研究集会名 第37回分子生物学会年会 開催場所 パシフィコ横浜ポスター・展示会場(展示ホール1階) 開催日 平成26年11月26日

(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HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
 (72) 発明者 清水 典明
 広島県東広島市鏡山一丁目4番4号 国立大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科内
 Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 DA02 EA04 FA13 G A11
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24
 4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24

(54) 【発明の名称】 哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるポリヌクレオチド

(57) 【要約】

【課題】哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高める手段を提供する。

【解決手段】本発明は、ヒトの第2番染色体短腕16.1の遺伝子密度の低い領域に由来する3,271bpのヒトゲノム断片B-3-31を発現促進ポリヌクレオチドとして利用する。

【選択図】図1

図1

```

AAATACCTAGACTCTGGAGTAACTGTTCCCTGTAACCCAGCTTGCAGAACATACATATGATGATTT
TGTCACTAGCTTAATTTGAATTTCTTADAATATACATGAAATCAAAATATATATCTGCTTTGGTCC
AGCTTTTTCAAGTATTATAGTGTTTTGGAGTCTATTGATGCTGTGCAATGATTTGTTGGTGTAT
AATTTTTTGATAAATAGTATTCAAATGTATTTATCTATTAGATGCTATTGATGCTGATTTAGTGTCT
TTGATTTTGGATGACAAATAAAGTTACTATGAACATTAITGACAGTCTCTGTGACATATATTTTA
AAAATATACCTAAATGTTGCCGTTTGGAAAGCCATTAATGAATGGATTTTATTTTGTGATTTT
ATTTGGTACATATAGTGTGCAATTTGTGAAAGTAAATTTAAGTCTGCTGCTGTGCAAGACACT
AATTTTTAGTACTTTTTTGGCTTCTTAAGATTTTCAATTTATAAAACTTGTACTGCAAAAAGA
AAAATAAATTCACCTCTTJGACAAGCTGTATAATATGTAATTTTGTCAAAATGATTTTGTAAAT
ACAGTGGTAAGACCCCTTACAATGTCGAATAGCACGCAAGTGTGCAATCTTAACTGTGATATAA
TTTTAGGTGGAAGATACAGTATTTGCCATTATGGGGTAGTTGGGTTTATCAAAAGCCCTTTAT
AGCTGATCAATTTGCTGTCTGATTTAGTATTAATGATTTGATTTTGTGCAATGCTTTGTC
ATCAAGTAAATCATATAGTGTATTTCTTTGATCTGTATTAATGGTGAATGTGATTAATGCTG
TAAATAAATCTACTGCTGATAGATGATGATGATTTTAACTGTTGGCACTTAATTAAGTACTGCT
TTTTTTTTAATATATCTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTT
ATGTCATGTTGGTGTGCTGACCCAGTAACTGATGATTAACATTAAGTATATCTCAAAATGCTGCT
CTCCCACTCCCCCAACCCCAACAGCCGCGTATGAAATGAACAAATGAAACACATGACACAGG
AAGGGCACTTACTAGTATTTCACTAGCAATTTACTGTTGCTTTTAAACGATATTTGCTATAGT
TTTCTCTTAAACATGCTGTTGTTTGGTGTGACAGCAGCAAGTAAAGCCCTTAAATGATTTGGAA
GTGTTCTTGTGCTTAAACACAGTAACTTAACTGCAACAAATGCTAAATATTTAGTCTTTT
GGATATTTCAATGATTTTAAATAAATATATGACAAATTTTGGCTGATGATGATTTTCTTAATA
CACACTGTATTTGCTAAGCTTGTATAAATTTTAACTTTGATGCTACTAGTAAGATTTGAAATG
AGTGTCTTTTGGATCAATCTCTGTTGTTGATTAATTAAGTAAATGCTTAAATGATTTAAAGT
GTTTTCTCTTACATAAATAAGGTTTTACAGCAGCAAAATTTATATCTGAATAAATTTCTCTGTTA
CATAGATTAAGTTGGCAGTCTGCTTTATTTCTGATTTGATATTTCTCTTTGATTTCTCTTTGA
TGCAATTTGATGCTGATTTAAATCATTAATATATGATTAATTTTAAAGCAATTTCTAAATATA
CTTTCTGACACACAGGTTGCTTGAATAATGACATATTTGCACTTGGTAAATGTTGTTTCAAT
ACATGGTCACATTTTATTTCCGTTCTGTTTGGTCTTTTGAACACAGTCTCACTGTGACCCAGTC
TGGAGTTCAAGTGGCATGAACCTTGGCTCACTGCAAACTCCAGCTCTGGGTCGAAGGATTTCCCTG
AGCTCCGAGTATGTTGGATACAGGCCCACACACAGTATGGCAGCAATTTTGTATTTTAAATAGG
CCCTGGTTTTCGATGTTGGGCAAGCTGCTGCAAGCTCTAGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AGCAAGTCTGGATCAAGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
ATAGTTTAAAGCACTAATATATCTCTCTATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GATTTGATATATCTCAATTTGTTTACATTTCAACTTTCTTTCTGATGATGATGATGATGATGAT
TGAGCAAAAATGAGGAGTCTAATAATTTGACCAAAATGTTGAGGATGATGATTTTCTATGACTC
CAGCTGGGAACTGGTAAACCCCTGATTAAGAGGCTGCCATTTTCTCAAGTAAAGCAAAATTTCT
TGTATATTTGTTAAATATAGCTCTCTTAACTGTTTTTATTTATTTATATGATGATTTATG
ATGCTGGATCTATTTATATGCTCAACACTGTTTGAATGATATGCTTTTGTGTTGCTTTGGTGGAA
TATTTATTTGCTTAAATTTTCCGTTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TATTTTGTGTTAAATAAATTAAGCTTTAGATATCTGTCAGACTGATGCTTTACTGATGTTGGAGGA
ATGCTTATGTTTAACTTAAATTTAAATAAAGCTTTTAACTGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAATATAAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAAGGAAATCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CTAGAGGATTAAGTTTCCAGGCTGCTTCACTAAAGAAATCAAGAAATCTGATGATGATGATGAT
TTCTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ACTAACTCAAAATAGATTTCTGAAATTAAGGCTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATG

```

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高める方法であって、
哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクターと、目的遺伝子と、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞に同時に導入する工程を含む方法：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 4 0 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記目的遺伝子と、上記ポリヌクレオチドとが、上記ベクターに含まれた状態で、哺乳動物細胞に導入することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるためのキットであって、
下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドを少なくとも備えることを特徴とするキット：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

【請求項 6】

哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域と哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域とを具備するベクターをさらに備える、請求項 5 に記載のキット。

30

【請求項 7】

上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来する、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 4 0 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来する、請求項 6 または 7 に記載のキット。

40

【請求項 9】

上記ベクターは目的遺伝子が挿入されるベクターであり、
上記発現促進ポリヌクレオチドは、上記ベクターに含まれていることを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 10】

哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクターと、目的遺伝子と、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドとが導入されてなる哺乳動物細胞：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若

50

しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

【請求項 1 1】

上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来する、請求項 1 0 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 2】

上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 4 0 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来する、請求項 1 0 または 1 1 に記載の哺乳動物細胞。

10

【請求項 1 3】

上記目的遺伝子と、上記発現促進ポリヌクレオチドとが、上記ベクターに含まれた状態で、哺乳動物細胞に導入されていることを特徴とする請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞を用いた、目的タンパク質を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

本発明は、哺乳動物細胞内で目的遺伝子を高度に増幅した際に起こる、目的遺伝子の発現抑制を回避（または軽減）し、目的遺伝子の発現を高める方法、および当該方法を行うためのキット等に関する。より具体的には、本発明者が開発した「高度遺伝子増幅系」を用いて高度に増幅した遺伝子に起こり得る発現抑制を回避（または軽減）して、増幅遺伝子を高発現させる手段に関する。また、当該方法により、目的遺伝子の発現が高められた形質転換細胞に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

本発明者は、哺乳動物の複製開始領域（I R ; I n i t i a t i o n R e g i o n ）と核マトリックス結合領域（M A R ; M a t r i x A t t a c h m e n t R e g i o n ）とを持つプラスミドベクター（「I R / M A R ベクター」または「I R / M A R プラスミド」という。）をヒト由来がん細胞（C O L O 3 2 0 大腸がん細胞株、および H e L a 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（ブラストサイジン（B l a s t i c i d i n ）あるいはネオマイシン（N e o m y c i n e ））を利用して選択するだけで、

30

(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 I R / M A R ベクター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見出し、上記 I R / M A R ベクターを用いて目的遺伝子を高度に増幅する系（「高度遺伝子増幅系」または「I R / M A R 遺伝子増幅系」という。）を完成させるに至った（例えば、特許文献 1、特許文献 2、非特許文献 1、および非特許文献 2 参照を参照のこと。）。ここで、高度遺伝子増幅系（I R / M A R 遺伝子増幅系）を用いた遺伝子増幅法を、「I R / M A R 遺伝子増幅法」と呼ぶ。

40

【0 0 0 3】

ところが、I R / M A R 遺伝子増幅法によって遺伝子増幅を行った場合、増幅した領域には目的遺伝子による単純反復配列が形成される。一般的に、反復配列は、頻繁に Repeat-Induced Gene Silencing（R I G S）と呼ばれる現象によって、ヘテロクロマチン化が起こり、転写抑制されることが知られている。また反復配列は R N A i 系を高効率的に活性化し、D N A のメチル化を誘導することも知られている。このため、I R / M A R 遺伝

50

子増幅法によって増幅した遺伝子は、コピー数とその発現量とが必ずしも比例しない場合があった（非特許文献3を参照のこと。）。

【0004】

遺伝子の反復配列に起因する転写抑制を解除する方法としては、例えばtrichostatin A等のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で細胞を処理する方法が知られている（非特許文献4を参照のこと。）。

【0005】

本発明者は、上記のようなIR/MAR遺伝子増幅法における反復配列に起因する遺伝子発現抑制の問題点を解決する手段を見出した（特許文献3を参照のこと。）。特許文献3には、(a) IR/MARベクターおよび目的遺伝子を哺乳動物細胞に導入する際に、
- ファージDNA等の10kbp以上のポリヌクレオチド、またはインシュレーター配列を含むポリヌクレオチドをコトランスフェクションする、(b) IR/MARベクターおよび目的遺伝子が導入された哺乳動物細胞を、漸増濃度の薬剤を含有する培地で培養して選抜する、(c) 目的遺伝子の発現を誘導するプロモーター活性を、転写活性化因子を用いて向上させる、(d) IR/MAR遺伝子増幅法を用いて増幅した遺伝子領域を、Cre-LoxP Systemで染色体外に切り出す、(e) IR/MAR遺伝子増幅法により遺伝子増幅が起こった細胞を5-aza-2'-deoxycytidineで処理を行ないDNAのメチル化のレベルを低下させる、(f) IR/MAR遺伝子増幅法による遺伝子増幅がダブルマイニユート染色体上で起きている上記哺乳動物細胞を選択するという手段が開示されている。

10

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【0006】

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

【特許文献2】特開2004-337066号公報（公開日：平成16（2004）年12月2日）

【特許文献3】国際公開第2006/054561号パンフレット（国際公開日：2006年5月26日）

【非特許文献】

【0007】

30

【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.

【非特許文献2】Noriaki Shimizu, et al (2003) Amplification of plasmids containing a mammalian replication initiation region is mediated by controllable conflict between replication and transcription. *Cancer Research*, vol.63, no.17, p5281-5290.

【非特許文献3】Shimizu, N., Hanada, N., Utani, K., and Sekiguchi, N. (2007). Interconversion of intra- and extra-chromosomal sites of gene amplification by modulation of gene expression and DNA methylation. *Journal of cellular biochemistry* 102, 515-529.

40

【非特許文献4】McBurney, M. W. et al, *Exp Cell Res* (2002), vol 274, p1-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上記のようなIR/MAR遺伝子増幅法における反復配列に起因する遺伝子発現抑制の問題点を解決し得る、新たな手段を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者はIR/MAR遺伝子増幅法においてコピー数が増えても反復配列のために発

50

現抑制されるという独自の問題点を解決するために、I R / M A R 配列を持って自発的に遺伝子増幅し得るプラスミド (I R / M A R ベクター) をベクターとして用いた独自のスクリーニング方法によって検討した結果、ヒトの第 2 番染色体短腕 16 . 1 の遺伝子密度の低い領域に由来する 3 , 271 (b p) のヒトゲノム断片 (以下、「B - 3 - 31」という。) を見出すことに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち本発明は以下の発明を包含する。

【 0010 】

本発明は、哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高める方法であって、哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクターと、目的遺伝子と、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞に同時に導入する工程を含む方法である：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

【 0011 】

また、本発明において、上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0012 】

また、本発明において、上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 40 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0013 】

また、本発明は、上記目的遺伝子と、上記ポリヌクレオチドとが、上記ベクターに含まれた状態で、哺乳動物細胞に導入することを特徴とする方法であってもよい。

【 0014 】

また、本発明は、哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるためのキットであって、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドを少なくとも備えることを特徴とするキットである：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

【 0015 】

本発明のキットは、哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域と哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域とを具備するベクターをさらに備えていてもよい。

【 0016 】

また本発明のキットにおいて、上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0017 】

また本発明のキットにおいて、上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 40 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0018 】

また本発明のキットにおいて、上記ベクターは目的遺伝子が挿入されるベクターであり、上記発現促進ポリヌクレオチドは、上記ベクターに含まれていてもよい。

【 0019 】

また本発明は、哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクターと、目的遺伝子と、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドとが導入されてなる哺乳動物細胞である：

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

【 0 0 2 0 】

また本発明の哺乳動物細胞において、上記哺乳動物複製開始領域が、c - m y c 遺伝子座、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子座、および - グロビン遺伝子座の複製開始領域のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0 0 2 1 】

また本発明の哺乳動物細胞において、上記核マトリックス結合領域が、I g 遺伝子座、S V 4 0 初期領域、および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のいずれか 1 つに由来するものであってもよい。

【 0 0 2 2 】

また本発明の哺乳動物細胞において、上記目的遺伝子と、上記発現促進ポリヌクレオチドとが、上記ベクターに含まれた状態で、哺乳動物細胞に導入されていてもよい。

【 0 0 2 3 】

また本発明は、上記本発明の哺乳動物細胞を用いた、目的タンパク質を生産する方法をも包含する。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 4 】

本発明によれば、I R / M A R 遺伝子増幅法によって形成される目的遺伝子の反復配列に起因する遺伝子発現抑制の問題点を解決することができ、所望のタンパク質を高発現させることが可能となるという効果を奏する。それゆえ本発明によれば、遺伝子増幅の手法により、有用タンパク質を大量に生産する系を樹立することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 B - 3 - 3 1 の塩基配列 (3 , 2 7 1 b p 、 配列番号 1) を示す図である。

【 図 2 】 本発明の実施例において使用した各種プラスミドの構築手順を示す模式図である。

【 図 3 】 本発明の実施例において使用したプラスミド p B M d2EGFP-Asc I の構築手順を示す模式図である。

【 図 4 】 本発明の実施例において使用した大腸菌 1 次ゲノムライブラリーのプラスミドの構築手順を示す模式図である。

【 図 5 】 LibraryB-3 3926 31 3.0 kbp が導入された C H O D G 4 4 細胞およびコントロールのベクター D N A が導入された C H O D G 4 4 細胞のそれぞれの G F P 発現強度を示すヒストグラムを重ねて表示したものであり、(a) (c) (e) は LibraryB-3 3926 31 3.0 kbp が導入された C H O D G 4 4 細胞の G F P 発現強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合、(b) (d) (f) はコントロールのベクター D N A が導入された C H O D G 4 4 細胞の G F P 発現強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

< 1 . 哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高める方法 >

本発明の一実施形態は、哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高める方法 (以下、適宜「本発明の方法」という。) に関する。本発明の方法は、哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクターと、目的遺伝子と、下記 (a) または (b) を含む発現促進ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞に同時に導入する工程を含むことを特徴としている。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列において 1 または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、且つ増幅された目的遺伝子の発現を高める活性を有するポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

特に、本発明は培養細胞等を用いたEx vivoの系において好ましく実施され得る。

【0027】

(1-1) 発現促進ポリヌクレオチド

本発明の方法は、IR/MAR遺伝子増幅法によって目的遺伝子が高度に増幅されたにもかかわらず、目的遺伝子の発現量が必ずしも比例しない場合があるという課題を解決するための方法である。換言すれば、IR/MAR遺伝子増幅法において、目的遺伝子の発現量を向上するための方法である。上記の課題は、IR/MAR遺伝子増幅法によって目的遺伝子の反復配列が生じ、これに起因して目的遺伝子の発現抑制が起こると考えられた。本発明者が考案した独自のスクリーニング方法によりスクリーニングを行った結果、ヒトゲノムから目的遺伝子の発現を高める活性を備えるポリヌクレオチド「B-3-31」を見出すことに成功した。本発明の方法は、当該B-3-31を発現促進ポリヌクレオチドとして利用する。「発現促進ポリヌクレオチド」とは、増幅された目的遺伝子の発現を高める活性（「発現促進活性」ともいう。）を有するポリヌクレオチドを意味する。

10

【0028】

B-3-31は、配列番号1に示される塩基配列からなる。よって本発明の方法において使用する発現促進ポリヌクレオチドの一実施形態としては、配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むものであるといえる。ただし、本発明の方法に使用する発現促進ポリヌクレオチドはこれに限定されるものではなく、増幅された目的遺伝子の発現を高める活性（「発現促進活性」ともいう。）を有するポリヌクレオチドであれば、配列番号1に示される塩基配列において1または数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加されたポリヌクレオチド（すなわち「変異ポリヌクレオチド」。）であってもよい。上記「数個」とは、例えば30個以下、好ましくは15個以下、より好ましくは10個以下、最も好ましくは5個以下の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加されていることを意味する。

20

【0029】

また配列番号1に示されている塩基配列を、クエリーとしてBLASTN 2.2.1などの相同検索プログラムを用いて、GenBankやEMBL、DDBJなどのデータベースに対して相同検索を行うことで得られた塩基配列からなるポリヌクレオチドを、本発明の方法において発現促進ポリヌクレオチドとして利用することは可能である。上記の変異ポリヌクレオチドまたは相同検索を行うことで得られたポリヌクレオチドと、配列番号1に示されるポリヌクレオチドとの相同性は、例えば、90%以上が好ましく、95%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、99%以上が最も好ましい。

30

【0030】

B-3-31は、ヒトゲノムから見いだされたポリヌクレオチドであるが、本発明の方法に用いられ得る発現促進ポリヌクレオチドとしては、発現促進活性を有しているポリヌクレオチドであれば、ヒト由来に限定されるものではなく、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウシ、ブタ、等の哺乳動物細胞由来であってもよい。

【0031】

なお、あるポリヌクレオチドが発現促進活性（増幅された目的遺伝子の発現を高める活性）を有しているか否かは、当該ポリヌクレオチドをPCRや化学合成等公知の手段を用いて取得し、これを後述する実施例において検討したように、IR/MARベクター、目的遺伝子（実施例の場合はEGFP遺伝子（Enhanced Green Fluorescent Protein遺伝子））、および当該ポリヌクレオチドを、哺乳動物細胞（実施例の場合はCHO DG44細胞）に導入した場合の目的遺伝子の発現量と、当該ポリヌクレオチドを導入せずIR/MARベクターおよび目的遺伝子を導入した場合の目的遺伝子の発現量とを比較し、前者の発現量よりも後者の発現量が上回っていた場合に、当該ポリヌクレオチドが発現促進活性を有していると判断できる。

40

【0032】

本発明の方法に用いられる発現促進ポリヌクレオチドとしては、配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドやその変異ポリヌクレオチドに対して、ストリンジェ

50

ントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが用いられ得る。なお、当該ポリヌクレオチドが発現促進活性を有していることは言うまでもない。

【0033】

上記「ストリンジェントな条件」とは、相同性が少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の時にハイブリダイゼーションが起こる得る条件を意味する。上記ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法のような周知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、また塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり(つまりハイブリダイズし難くなる)。例えば、42℃、6×SSPE、50%ホルムアミド、1%SDS、100μg/ml サケ精子DNA、5×デンハルト液(ただし、1×SSPE; 0.18M 塩化ナトリウム、10mMリン酸ナトリウム、pH7.7、1mM EDTA。5×デンハルト液; 0.1% 牛血清アルブミン、0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン)が、ストリンジェントな条件の一例として挙げられる。

10

【0034】

さらに本発明の方法に用いられる発現促進ポリヌクレオチドとしては、配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドやその変異ポリヌクレオチドの全長のポリヌクレオチドのみならず、これらのポリヌクレオチド断片が利用され得る。本発明の方法に利用するに当たり、当該ポリヌクレオチド断片が発現促進活性を有していることは言うまでもない。ポリヌクレオチド断片が発現促進活性を備えているか否かは、配列番号1にかかるポリヌクレオチドやその変異ポリヌクレオチドの断片を調製し、上述の実験により当該ポリヌクレオチド断片が発現促進活性を有しているかどうか確認すればよい。なお、本発明者の解析によれば、B-3-31には、Stress-Induced Duplex Destabilization (SIDD)とinverted repeatとが隣接して存在する。このような領域は、MAR活性を示す可能性が示唆されている。よって、この領域を少なくとも含むポリヌクレオチドであれば発現促進活性を有している可能性があるかと判断できる。

20

【0035】

本発明の方法に用いられる発現促進ポリヌクレオチドを構成するポリヌクレオチドの鎖長は特に限定されるものではないが、特許文献3が10kbp以上のポリヌクレオチドを用いることを規定している為、これとの差別化のためには、上限として10kbp未満であることが好ましい。また発現促進ポリヌクレオチドを構成するポリヌクレオチドの鎖長の下限としては、発現促進活性を有する最小限の鎖長とすることができる。

30

【0036】

なお、本発明の方法に用いられる発現促進ポリヌクレオチドにかかるポリヌクレオチドは、その5'側または3'側には、クローニングのためのリンカーDNAや、マルチクローニングサイト等の制限酵素サイトにかかる塩基配列などが付加されていてもよい。

【0037】

(1-2) IR/MARベクターおよび目的遺伝子

40

本発明にかかる方法は、上述の発現促進ポリヌクレオチドとともに、哺乳動物細胞内で機能する哺乳動物複製開始領域および哺乳動物細胞内で機能する核マトリックス結合領域を具備するベクター(「IR/MARベクター」という。)と、目的遺伝子とを、哺乳動物細胞に同時に導入する工程を含む方法である。

【0038】

上記複製開始領域(IR)としては哺乳動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(以下、適宜「DHFR」という。)遺伝子座、 α -グロビン遺伝子座等の複製開始領域が挙げられる。なおc-myc遺伝子座の複製開始領域については、例えば「McWhinney, C. et al., Nucleic Acids Res. vol. 18, p1233-1242 (1990)」に記載されている。DHFR遺伝子座の複

50

製開始領域については、例えば「Dijkwel, P.A. et al., Mol. Cell. Biol. vol.8, p539 8-5409 (1988)」に記載されている。 - グロビン遺伝子座の複製開始領域については、例えば「Aladjem, M. et al., Science vol. 281, p1005-1009 (1998)」に記載されている。

【0039】

また核マトリックス結合領域(MAR)としては、哺乳動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、I γ 遺伝子座、SV40初期領域、ジヒドロ葉酸リダクターゼ(DHFR)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、I γ 遺伝子座の核マトリックス結合領域については、例えば「Tsutsui, K. et al., J. Biol. Chem. vol. 268, p12886-12894 (1993)」に記載されている。SV40初期領域の核マトリックス結合領域については、例えば「Pommier, Y. et al., J. Virol., vol 64, p419-423 (1990)」に記載されている。DHFR遺伝子座の核マトリックス結合領域については、例えば「Shimizu N. et al., Cancer Res. vol. 61, p6987-6990」に記載されている。

【0040】

本発明の方法において利用されるIR/MARベクターには、IRおよびMAR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、あるいは、マーカータンパク質として薬剤耐性遺伝子(プラスト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EGFP遺伝子等の蛍光タンパク質遺伝子等を選択マーカーとして有してもよい。これらの選択マーカーを指標としてIR/MARベクターが導入された細胞を選別できる。

【0041】

一方、本発明の方法において利用される「目的遺伝子」とは、発現させるべきタンパク質(「目的タンパク質」という。)をコードするポリヌクレオチドのことである。よって、目的遺伝子は、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。当該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。

【0042】

目的遺伝子は、プロモーターに制御可能に連結されていることが好ましい。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(「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初期領域由来プロモーター(SV40プロモーター)、SR α プロモーター(SR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。

【0043】

目的遺伝子は、その他、ターミネーター等目的遺伝子の発現に必要なポリヌクレオチドや、制限酵素サイトや薬剤耐性遺伝子等のクローニングに必要なポリヌクレオチドが含まれていてもよい。

【0044】

(1-3) 導入工程

本発明にかかる方法は、IR/MARベクターと、目的遺伝子と、発現促進ポリヌクレオチドとを、哺乳動物細胞に同時に導入する工程(「導入工程」という。)を含む方法である。

【0045】

ここで、上記哺乳動物細胞としては、特に限定されるものではなく、各種哺乳動物由来

10

20

30

40

50

の細胞（例えば、各種哺乳動物由来の培養細胞）が本発明において利用され得る。例えば、チャイニーズハムスター由来のCHO細胞や、各種腫瘍細胞等が挙げられる。CHO細胞としては、例えば、CHO-K1細胞（ATCC CCL-61、RIKEN RCB0285、RIKEN RCB0403等）や、CHO-DG44細胞が挙げられる。CHO細胞は、現在、医薬等の有用タンパク質の実生産に用いられており、安全性が確認されている細胞であり、本発明の方法が適用される哺乳動物細胞としては好ましい。ただし、遺伝子増幅効率が高いという点では、無限増殖能を有する腫瘍細胞が好ましい。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 acentric fragments by micronuclei provides a rapid method for purifying extrachromosomally amplified DNA. Nat. Genet., 12: 65 - 71, 1996.」を参照のこと。

10

【0046】

なお、導入工程は、IR/MARベクターと、目的遺伝子と、発現促進ポリヌクレオチドと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、IR/MARベクターに、目的遺伝子と発現促進ポリヌクレオチドと挿入して同一の遺伝子構築物として導入してもよいし、それぞれが別体の遺伝子構築物として導入してもよい。また上記3つエレメントの内の2つのエレメントが同一の遺伝子構築物で、残り一つのエレメントが別体の遺伝子構築物として導入してもよい。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。なお実施例では、全てのエレメントが同一の遺伝子構築物として導入された場合の結果のみが示されているが、各エレメントがそれぞれ別体の遺伝子構築物として導入しても遺伝子増幅が起こる点については、IR/MAR遺伝子増幅法の特徴点として知られている事実である（例えば、特許文献1等を参照のこと）。よって、実施例において実験するまでもなく、当業者であれば、各エレメントがそれぞれ別体の遺伝子構築物として導入しても本発明の方法の効果が得られることを理解する。

20

【0047】

本発明の方法における導入工程は、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、利用可能である。またその詳細な条件については、導入される哺乳動物や、各エレメント等に応じて適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

30

【0048】

（1-4）その他の工程

なお本発明にかかる方法には、上記導入工程の他に、目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが導入された哺乳動物細胞を分離する工程（以下、「選抜工程」という）や、当該選抜工程によって選抜された哺乳動物細胞（すなわち形質転換細胞）を培養する培養工程（以下、「培養工程」という）が含まれていてもよい。また、上記培養工程によって生産された目的タンパク質を精製する方法（以下、「精製工程」という）が含まれていてもよい。すなわち本発明は、目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが導入された哺乳動物細胞を用いた目的タンパク質を生産する方法をも包含する。

40

【0049】

上記「選抜工程」は、目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが導入された哺乳動物細胞を分離する工程である。より詳細には、選抜工程は、目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが導入されていない哺乳動物細胞、および目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドと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。かかる選抜工程によって、哺乳動物細胞に導入された目的遺伝子を高発現し得る哺乳動物細胞を選抜することができる。

【0050】

50

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、目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドと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目的遺伝子とベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが導入された哺乳動物細胞を選抜すればよい。また、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目的遺伝子、IR/MARベクター、または発現促進ポリヌクレオチド由来のポリヌクレオチドを検出することによっても選抜工程を行い得る。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。

【0051】

上記「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、目的遺伝子を哺乳動物細胞において高発現させることができる。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。

10

【0052】

上記「精製工程」は、上記培養工程によって生産された目的タンパク質を精製する方法である。本精製工程におけるタンパク質精製の具体的方法としては、例えば、哺乳動物細胞をPBS (Phosphate Buffered Saline) 等の緩衝溶液に懸濁した後、ホモジェナイザーまたは超音波等で細胞を破碎し、遠心分離をして上清を回収する。上記緩衝溶液には、タンパク質の可溶化を促進するための界面活性剤や、タンパク質の立体構造を安定化するための還元剤、タンパク質の分解を防止するためのプロテアーゼインヒビターを適宜添加することもできる。上記界面活性剤としては、CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propanesulfonate]、Triton X-100、Nikkol、n - オクチルグリコシド等を利用することができる。また、上記還元剤としては、DTT (dithiothreitol)、DET (dithioerythritol) 等を利用することができる。また、上記プロテアーゼインヒビターとしては、アプロチニンや、ロイペプチンを利用することができる。

20

【0053】

上記上清から、目的タンパク質をアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ろ過クロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィーを用いて、精製することができる。また、精製されたタンパク質溶液を適当な緩衝液に透析することで不要な塩を除去することもできる。上記のタンパク質の精製工程は、タンパク質の分解を抑えるために低温条件下で行われることが好ましい。特に4℃下で精製工程が行われることが好ましい。なお、上記精製工程の具体的方法は、この限りではなく、公知の方法を適宜利用され得る。

30

【0054】

< 2 . 哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるためのキット >

上述した発現促進ポリヌクレオチドを少なくとも含むことで、哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるためのキット(「本発明のキット」という。)を構成することができる。本発明のキットによれば、IR/MAR遺伝子増幅法によって高度に増幅された目的遺伝子の発現量を高めることができる。発現促進ポリヌクレオチドに関する説明については、前項の説明を援用する。なお、本発明に係るキットは、遺伝子増幅によって生じた反復配列が原因で起こる発現抑制を回避または軽減することによって、目的遺伝子の発現を高めることを原理としている為、IR/MAR遺伝子増幅法のみならず、他の遺伝子増幅法においても奏功する可能性が有る。

40

【0055】

本発明のキットは、特にIR/MAR遺伝子増幅法に好ましく適用され得るため、本発明のキットには、発現促進ポリヌクレオチドに加え、IR/MARベクターが含まれていてもよい。IR/MARベクターの説明については、前項の説明を援用する。

【0056】

目的遺伝子としては、本発明のキットの使用者が適宜選択し得る為、本発明のキットには目的遺伝子は含まれていなくてもよい。ただし、試行用の目的遺伝子サンプルとして、

50

E G F P 遺伝子等の公知のタンパク質をコードする遺伝子が含まれていてもよい。

【0057】

本発明のキットに I R / M A R ベクターが含まれている場合、I R / M A R ベクター上には発現促進ポリヌクレオチドが挿入されていてもよいし、I R / M A R ベクターと発現促進ポリヌクレオチドとが別体となってもよい。

【0058】

本発明のキットには、形質転換に必要な機器や試薬、宿主となる哺乳動物細胞、その他取扱説明書などがさらに含まれていてもよい。

【0059】

< 3 . 本発明の哺乳動物細胞 >

本発明は、I R / M A R ベクターと、目的遺伝子と、発現促進ポリヌクレオチドとが導入されてなる哺乳動物細胞をも包含する。当該哺乳動物細胞は、本発明の方法が施された哺乳動物細胞の形質転換体であり、高度に増幅された目的遺伝子が高発現し得る細胞である。当該哺乳動物細胞を培養することによって、目的タンパク質を大量に生産することが可能となる。I R / M A R ベクター、目的遺伝子、発現促進ポリヌクレオチド、哺乳動物細胞等の説明については、前項の説明を援用する。

10

【0060】

本発明は上述した各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、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ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。

20

【実施例】

【0061】

< 1 . 方法 >

(1) プラスミドの構築

本実施例に用いたプラスミド名と構築法を示す。全てのプラスミドは、HighPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen社) を用いて、推奨されるプロトコルに従って精製されたものが使用された。

【0062】

(1 - 1) pSFVdhfr、pSFV-V、pSFV-V BN

pSFVdhfr (10 , 986 bp、図2参照のこと。) は John Kolman 博士と Geoffrey M. Wahl 博士 (The Salk Institute, CA) から供与された。このプラスミドは、チャイニーズハムスター D H F R 遺伝子座由来の 4 . 6 k b p の I R を持つ。この I R は D H F R 遺伝子座内で優先的に複製が開始する Ori 領域に由来する (参考文献 : Altman, A.L., and Fanning, E. (2001). Molecular and cellular biology21, 1098-1110.、および Pelizon, C., Diviacco, S., Falaschi, A., and Giacca, M. (1996). Molecular and cellular biology 16, 5358-5364.)。また上記 I R は、その中に M A R 活性を示す配列が存在する (参考文献 : Shimizu, N., Miura, Y., Sakamoto, Y., and Tsutsui, K. (2001). Cancer research 61, 6987-6990.)。このプラスミドは、プラストサイジン抵抗性遺伝子 (B S R) およびヒグロマイシン抵抗性遺伝子 (H y g) の2つの薬剤耐性遺伝子を持つ。

30

【0063】

pSFVdhfr から D H F R 遺伝子由来の配列を N o t I 消化により除いたものが pSFV-V (6 , 335 bp、図2参照のこと。) である。また、pSFV-V から H y g 領域を B a m H I および N r u I 切断により除いて構築したプラスミドが pSFV-V BN (4 , 083 bp、図2参照のこと。) である。

40

【0064】

(1 - 2) p BM-MCS

p BM-MCS は、以下のようにして構築された (参考文献 : Harada, S., Uchida, M., and Shimizu, N. (2009). J Biol Chem 284, 24320-24327.、図2参照のこと。)。

【0065】

すなわち、pSFVdhfr を B a m H I および M l u I で切断することで H y g 遺伝子領域を

50

除き、この位置に合成マルチクローニングサイト (MCS) 2 本鎖 DNA をコヒーシブエンドライゲーションで挿入することにより、p BM-MCS (8, 824 bp) が構築された。MCS の配列は、IR/MAR 下流より BamHI - KpnI - AscI - SalI - SmaI - AclI - SbfI - BamHI - MluI と続く 62 bp の配列からなる。

【0066】

(1-3) p BM-d2EGFP

p BM-d2EGFP は以下のようにして、構築された (参考文献: Harada, S., Uchida, M., and Shimizu, N. (2009). *J Biol Chem* 284, 24320-24327.、図 2 参照のこと。)

【0067】

まず p BM-MCS をその MCS 内に存在する AscI および AclI で切断した。一方で、pCMV-d2EGFP (Clontech 社) の d2EGFP 発現カセット部分を PvuI および BssHI で切り出した。AscI と PvuI、AclI と BssHI 断片とは、それぞれコヒーシブである。そこで、d2EGFP 発現カセットを p BM-MCS 内にコヒーシブエンドライゲーションにより挿入することで、p BM-d2EGFP (11, 169 bp) が構築された。

【0068】

(1-4) p BM d2EGFP-Asc I

p BM d2EGFP-Asc I は、以下のようにして構築された (図 3 を参照のこと。)

【0069】

まず p BM d2EGFP をその MCS 内に存在する MluI で切断した。この直鎖状 DNA と、図 3 に示す合成リンカー DNA (センス鎖: 配列番号 2 およびアンチセンス鎖: 配列番号 3) とを、In-Fusion (登録商標) 酵素 (タカラバイオ株式会社) で連結することにより、p BM d2EGFP-Asc I (11, 213 bp) は構築された。ここで用いられた合成リンカーは、中央に AscI サイトを持ち、その両端に、ヒトゲノム断片の両端に付与した配列と同じ 15 塩基配列、MluI サイト、および p BM d2EGFP を MluI で切断した両末端の塩基配列からなる。

【0070】

(2) 動物細胞株と、その培養方法

(2-1) COLO320DM 細胞株: 神経内分泌細胞由来ヒト大腸がん細胞株 (ATCC CCL-220)。COLO 320DM 細胞は、がん遺伝子 *c-myc* を含む単一の増幅単位が、DM の形態で、約 62 倍に増幅した細胞である。増幅遺伝子は分裂期中期染色体標本中に見られる平均して 43.6 ± 27.6 個の DM 上に位置している (参考文献: Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H., and Bishop, J.M. (1983). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1701-1711.、および Shimizu, N., Kanda, T., and Wahl, G.M. (1996). *Nat Genet* 12, 65-71.)。

【0071】

この細胞株の培養には CO₂ インキュベーター (MCO-17AIC、三洋電機株式会社製) を用い、培養温度は 37 °C、CO₂ 濃度は 5% (v/v) に設定した。培養液には RPMI 1640 培地 (日水製薬製) を用い、規定通り溶解後オートクレーブ滅菌 (120 °C、15 分) を行った。その後、炭酸水素ナトリウム (ナカライテスク株式会社) を適量加え、L-グルタミン (片山化学工業株式会社) を 0.03% (w/v)、FCS (Fetal Calf Serum; Euroclone 社) を 10% (w/v) となるように加えて使用した。約 3 日ごとに継代培養を行った。

【0072】

(2-2) CHO DG44 細胞株: CHO は Chinese Hamster Ovary の略でチャイニーズハムスターの卵巣から樹立された正常不死化線維芽細胞株である。CHO DG44 細胞は、ガンマ線を使用した突然変異誘導で dhfr 遺伝子座を完全に除去した CHO 細胞である (参考文献: Urlaub, G., and Chasin, L.A. (1980). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 4216-4220.)。Dhfr (ジヒドロ葉酸還元酵素; dihydrofolate reductase) はグリシン、プリン、チミジル酸

10

20

30

40

50

の合成のための必須酵素である。この細胞株の細胞培養にはCO₂インキュベーター（MC O-17AIC、三洋電機株式会社製）を用い、培養温度は37℃、CO₂濃度は5%（v/v）に設定した。培養液にはHam's F-12培地（和光純薬工業株式会社製）を用いた。FCSを10%（w/v）となるように加えて使用した。細胞の継代は、PBS（日水製薬製）とTrypLETM Express（Life Technologies Corporation）を用いて約3日ごとに行われた。

【0073】

（3）1次ゲノムライブラリーの構築

ベクタープラスミドpBMd2EGFP-AscIに、ランダムに断片化したヒトゲノムDNAを挿入することで、1次ゲノムライブラリーを構築した。以下にその工程を記す。

【0074】

（3-1）ヒトゲノムDNAの抽出

対数増殖期のヒトCOLO 320 DM細胞培養液を50mL遠心管（住友ベークライト社製）に移し、遠心分離を行った（TSローター、1,000rpm、5分間、室温、トミー精工LC06-SSp遠心機、以下同じ。）。上清を除いた後、PBS（-）50mLで再懸濁し、遠心分離を行うという遠心洗浄を2回繰り返した。10mLのDNA lysis buffer（50mM Tris-Cl, pH 8.0、1mM EDTA-Na, pH8.0、0.5% SDS）を、細胞の沈殿に加えて穏やかに混合した。続いて、RNase A（シグマ-アルドリッチ社）を100μg/mLの濃度で37℃、1時間処理することによりRNAを消化した後、Proteinase K（シグマ-アルドリッチ社）を100μg/mLの濃度で50℃、一晚処理した。その溶液を1時間以上かけてフェノール処理し、フェノール/クロロホルム処理を2回（1時間および30分間）行った後、エタノール沈殿法によってDNAを回収した。これにTEを1mL加え、DNA塊が融解するまで50℃で加温し、融解後4℃で保存した。

【0075】

（3-2）ヒトゲノムDNAの断片化

ヒトゲノム断片をベクタープラスミドに組み込むため、予めヒトゲノムDNAを超音波処理により、ランダムに1,000~3,000bp程度に断片化した。

【0076】

まず、ヒトCOLO 320DM細胞から抽出したDNAをTEで希釈し、液量500μL、濃度100μg/mLに調製した。これをEpiShearTM Probe Sonicator（ACTIV MOTIF社）を用いて、1,000~3,000bpのDNA断片が最も多く得られる条件（Duty = 30、Output = 2、15秒間）で超音波処理を行った。

【0077】

（3-3）Polyethylene Glycol（PEG）沈殿

高分子量のポリエチレングリコールを添加して遠心すると、短いDNAは沈殿せずに長いDNAのみを沈殿させることが出来る。前項で断片化したDNA 50μgをTEに溶かし全量を200μLとした。これに20%（w/v）のPEG 8000（Powder Molecular Biology Grade, Promega社）/ 30mM MgCl₂溶液100μLを混ぜ（終濃度約6.7% PEG、10mM MgCl₂）、ボルテックスミキサーにかけた。その後、ただちに15,000rpm、室温、10分間、遠心分離を行い、上清を除いた。70%（v/v）エタノールを300μL加え、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を除いてドライアップした後、20μLの超純水に溶かした。この操作により約600bp以下のサイズのヒトゲノム断片を除いた。

【0078】

（3-4）DNA末端の平滑化

ランダムに断片化されたヒトゲノムDNAの末端を、3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つKOD DNA Polymerase（東洋紡株式会社）を用いて平滑化（Blunting）した。すなわち、10×KOD Buffer（東洋紡株式会社）5.0μL、2mM dNTP（東洋紡株式会社）5.0μL、25mM MgCl₂ 2.0μL、KOD DNA polymerase（2.5U/mL）2.5μLを、前項でPEG沈殿を行なったDNA断片溶解液に加え、超純水

10

20

30

40

50

を加えて全量 50 μ L にメスアップした。この溶液を 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ、DNA 末端を平滑化した。

【0079】

(3-5) Asc I-S/Asc I-AS アニールリングによるリンカーの作製

ベクタープラスミド (p BM d2EGFP-Asc I) を Asc I で切断した時の末端 15 塩基対と相同な 2 本鎖 DNA を合成した。すなわち、Asc I-S 鎖 (5'-aagcagtggatcaaggcgcgc c-3' : 配列番号 4) および Asc I-AS 鎖 (3'-ggcgcgccttgataccactgcttac-5' : 配列番号 5) の各 10 pM の溶液を 100 μ L ずつ混合し、これに 5 M NaCl 4 μ L を加え、95 $^{\circ}$ C、10 分間、熱変性した後、30 秒毎に 0.5 $^{\circ}$ C ずつ温度を低下させ、12 まで反応させることにより、リンカー DNA (Asc I-S / Asc I-AS リンカー DNA) を作製した。

10

【0080】

(3-6) リンカーライゲーション反応

前項にて作製したリンカー DNA を、ヒトゲノム断片の末端にライゲーションした。すなわち、Bluntingを行ったヒトゲノム断片と作製したリンカー DNA とを、ヒトゲノム断片 : リンカー DNA のモル比が 1 : 1000 で全量 100 μ L になるように溶液を調製した。この溶液に Ligation high (東洋紡株式会社) を 50 μ L 加え、16 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、PCR 精製カラム (Roche High pure PCR cleanup micro kit) を用いて付属のプロトコル通りに DNA 溶液を精製し、さらに、PEG 沈殿 (終濃度 10% (w/v)) を行うことで余分なリンカー DNA を除去した。

20

【0081】

(3-7) In-Fusion 反応と大腸菌 1 次ゲノムライブラリーの構築

リンカー DNA を付加したヒトゲノム断片と Asc I で切断した直鎖状ベクター p BM d2EGFP-Asc I を In-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて連結した (図 4 を参照のこと。)。その後、In-Fusion 反応液で大腸菌 DH5 株のコンピテントセルを形質転換し、Ampicillin sodium salt (ナカライテスク株式会社) 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地上にまき広げて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。多数の異なる大きさのヒトゲノム断片を含む大腸菌コロニーから成る、大腸菌 1 次ゲノムライブラリーを得た。

【0082】

(3-8) コロニー PCR によるヒトゲノム領域の増幅

各ライブラリーで、コロニーごとの挿入ヒトゲノム断片の鎖長を確認するため、ヒトゲノム断片が挿入された領域が PCR で増幅されるように、ヒトゲノム断片にライゲーションしたリンカー DNA の配列とアニールするようなプライマー (in-fusion Asc I-S : 5'-aagcagtggatcaagg-3' : 配列番号 6) を設計した。このプライマーと Blend Taq (登録商標) -Plus- (東洋紡株式会社) を使用して、各大腸菌 1 次ライブラリーについてコロニー PCR を行った。PCR 反応液 10 μ L は 1 x Blend Taq (登録商標) Buffer (東洋紡株式会社)、200 μ M dNTPs (東洋紡株式会社)、0.25 units Blend Taq (登録商標) -Plus- (東洋紡株式会社)、2 pM プライマーを含む。大腸菌コロニーのピックには 200 μ L ピペットチップ (WATSON 社) を用いた。チップの先端部でシングルコロニーをピックアップし、PCR 反応液に浸すことで、菌体内で複製されたプラスミドを反応液内に溶かし出し、PCR の鑄型とした。PCR 反応条件は、変性を 94 $^{\circ}$ C、30 秒間、アニールを 59 $^{\circ}$ C、30 秒間、伸長を 72 $^{\circ}$ C、2 分間とし、35 サイクル行った。反応産物は、1.0% アガロースゲルで 100 V、30 分間、アガロースゲル電気泳動することで解析した。

30

40

【0083】

(3-9) ライブラリープラスミドの回収

10 cm dish の LB 寒天培地上の大腸菌コロニーに、プレート 1 枚あたり LB 液体培地を 10 mL 加え、コンラージ棒を使用して掻き取り、PureLinkTM Hipure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen 社) を用いて付属のプロトコルに従いプラスミド DNA を精製し

50

た。その後、大腸菌プレート3枚から精製したプラスミドDNAあたり、TE 100 μ Lに溶解した。

【0084】

(4) 哺乳動物細胞の形質転換

全ての形質転換には、Lipofectamine (登録商標) 2000 (Invitrogen社)を用いて、リポフェクション法により行った。初めに、対数増殖期にあるCHO DG44細胞(4.0 \times 10⁵ cells/mL、2 mL)を、3 cm dish (住友ベークライト株式会社)に植え継ぎ、CO₂ インキュベーター内で1日培養した。次にOpti-MEM (Life Technologies社) 250 μ Lに対し、導入するプラスミドDNA (4.0 μ g)を加え、ピペッティングにより混合して「DNA希釈液」を調製した。10.5 μ LのLipofectamine (登録商標) 2000と262.5 μ LのOpti-MEMとを混ぜ、ピペッティングした後、5分間静置し、「Lipofectamine (登録商標) 希釈液」を調製した。Lipofectamine (登録商標) 希釈液 260 μ LをDNA希釈液に加え、ピペッティング操作でよく混合した後、20分間静置した。この溶液を培養しておいた細胞に全量加え、4時間後に新鮮なF-12培地(10% (w/v) FBSを含む)と入れ替えた。さらに翌日(トランスフェクション1日後)、細胞を10 cm dish (住友ベークライト株式会社)にスケールアップし、全量10 mLとした。さらに、その翌日(トランスフェクション2日後)にBlasticidin S Hydrochloride (フナコシ株式会社)を終濃度10 μ g/mLで加え、形質転換された細胞を選択した。その後、細胞がコンフルエントになったら植え継ぎ、プラストサイジンによる薬剤選択圧を終濃度100 μ g/mLに上げて培養した。増殖の程度を見ながら、培地を一部交換して培養を続け、約4週間培養することで安定した形質転換体を得た。

10

20

【0085】

(5) 大腸菌1次ゲノムライブラリーのスクリーニング

(5-1) FACS AriaによるGFP高発現細胞のソーティング

FACS (Fluorescence activated Cell Sorter) は、一点に集められたレーザー光を、フローセル中を通過する細胞に照射し、そこから生じる散乱光と、蛍光を同時に測定する。加えて、その情報に基づき特定の細胞だけを、生きたまま分取することが可能である。

【0086】

対数増殖期にある安定した形質転換細胞を細胞培養フラスコ(Orange Scientific社)で培養した。これらについて、FACS Aria (Becton, Dickinson and Company)を用いてGFP発現強度を解析し、発現上位0.1%~2.0%の細胞を、接着細胞用マルチプレート96 F (住友ベークライト株式会社)に1ウェル当たり1~10個ずつソートした。96ウェルプレートには、新鮮なF-12培地とCHO DG44細胞を培養したConditioned Mediumとを7:3の割合で混合し、プラストサイジンおよびペニシリンを10 μ g/mLになるように、各ウェルに100 μ Lずつ前もって加えた。分取した細胞をCO₂ インキュベーター内で、37℃で培養した。

30

【0087】

(5-2) 蛍光顕微鏡観察によるGFP高発現細胞の選別

96ウェルプレートにソートした細胞を、培地が蒸発してしまわないようにF-12培地(10 μ g/mLのプラストサイジンを含む)を加えて3~4週間培養した。その後、蛍光顕微鏡を用いて各細胞コロニーのGFP発現を観察し、特に発現の強い細胞コロニーを24ウェルプレートにスケールアップし、更に1週間程度培養した。再び蛍光顕微鏡で各細胞コロニーのGFP発現を観察し、発現の特に強い細胞については個別に細胞を回収し、比較的弱い細胞については10ウェル程度の細胞をまとめて回収した。

40

【0088】

(5-3) 細胞からのDNA抽出

Dishから剥がした細胞を遠心分離(TSローター、1000 rpm、5分、室温、トミー精工LC06-SSp遠心機、以下同じ。)して沈殿とした後、上清を除き、回収したときの培地と等量のPBS(-)を加えて、遠心することによる遠心洗浄を2回繰り返した。細

50

胞濃度が 2×10^6 cells/mL となるように lysis buffer (65 mM Tris HCl, pH 8.8、16.6 mM ammonium sulfate、1 mM mercaptoethanol、6.7 mM EDTA、0.5% TritonX-100) を加え、Proteinase K を終濃度 0.06 mg/mL となるように加えた。ウォーターバスで 50℃、1 時間以上加温し、その後、94℃ で 12 分間加温して 1.5 mL チューブに移し、10,000 g、3 分間、室温で遠心分離を行い、上清を回収して 4℃ で保存した。

【0089】

(6) 2次ゲノムライブラリーの構築

前項で抽出した 1 次ゲノムライブラリー導入 CHO-DG44 細胞の DNA を鋳型として、PCR 法によりヒトゲノム断片を増幅した。この時プライマーとして in-fusion Asc I-S を使用した。PCR 反応条件は、変性を 94℃、30 秒間、アニーリングを 59℃、30 秒間、伸長を 72℃、2 分間とし、30 サイクル行なった。PCR 産物と、Asc I で切断した直鎖状ベクター p-BM-d2EGFP-Asc I とを In-Fusion 反応で連結した。その後、In-Fusion 反応液で大腸菌コンピテントセル DH5α を形質転換し、大腸菌 2 次ゲノムライブラリーを構築した。そして、大腸菌 1 次ライブラリーと同じようにコロニー PCR 法により挿入ヒトゲノム断片の鎖長と割合を計測した。

10

【0090】

大腸菌 1 次ライブラリーと同じ手法で、大腸菌 2 次ライブラリーからプラスミド DNA を回収し、CHO-DG44 細胞へのトランスフェクションを行い、薬剤選択を経て安定した形質転換細胞を獲得した。

20

【0091】

(7) フローサイトメーターによる解析

(7-1) 細胞の調製

対数増殖期にある細胞培養液 5 mL を 15 mL 容の遠心管に回収し、遠心して上清を除き、PBS 2 mL で懸濁した。測定を行うまで細胞懸濁液を氷中で保存し、測定直前に 5 mL 容のポリスチレンチューブ付きセルストレーナー (Becton, Dickinson and Company) に通して細胞凝集塊を除いた。

【0092】

(7-2) FACS Calibur を用いた GFP 発現強度の計測

Becton Dickinson 社の FACS Calibur を使用し、Cell Quest Pro Software を用いて細胞あたりの蛍光強度を測定した。細胞の大きさ (前方散乱光 forward scatter、FSC)、内部構造 (side scatter、SSC) を測定し、この情報をもとに生細胞についてのみゲートをかいた。ゲートをかいた 20,000 の細胞集団について、GFP の蛍光強度を定量した。測定条件は下記の通り。

30

測定条件；

Detectors/Amps：

Parameter P1;Detector：FCS、Voltage：E00、AmpGain：1.50、Mode：Lin、

Parameter P2;Detector：SSC、Voltage：350、AmpGain：1.35、Mode：Lin、

Parameter P3;Detector：FL1、Voltage：600、AmpGain：1.00、Mode：Log。

【0093】

(8) 陽性 2 次ライブラリーを構成するプラスミドのクローン化

再現性良く GFP 高発現を示すライブラリーのプラスミド DNA で、大腸菌コンピテントセル SURE2 株 (Agilent Technologies 社) を形質転換し、コロニーを形成させた。SURE2 はこれまで用いてきた大腸菌 DH5α のコンピテントセルに比べて、反復配列 (Inverted Repeat) や、Z-DNA などの二次構造を作りやすい不安定な配列をもつ DNA のクローニングに適したコンピテントセルである。Tks Gflex (登録商標) DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いたコロニー PCR 法により、各大腸菌コロニーのヒトゲノム断片の有無、及びその鎖長を確認した。PCR 反応液 10 μL は 1 × Tks Gflex (登録商標) DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社)、2 × Gflex (登録商標) PCR Buffer (Mg²⁺、dNTP plus) (タカラバイオ株式会社)、2 pM Primer (in-fu

40

50

sion AscI-S)を含む。PCR反応条件は(3-8)の項で示した条件と同条件で行った。さらに、同じ鎖長のPCR産物を区別するために、4塩基認識制限酵素Sau3AI(タカラバイオ株式会社)で37℃、90分間処理した後、電気泳動で解析することも行った。このようにして単離した大腸菌を、アンピシリン 100 µg/mLを含むLB液体培地50 mL、37℃、140 rpmの条件で12時間、振盪培養を行った。大量培養した大腸菌はPureLink™ Hipure Plasmid Midiprep Kit(Invitrogen社)を用いて付属のプロトコルに従い精製を行った。精製したプラスミドはオートクレーブ・フィルター滅菌済みTE 100 µLに溶解し、4℃で保存した。

【0094】

(9) ヒトゲノムDNAの塩基配列決定

10

(9-1) DNAシーケンス反応

4種類の蛍光色素で標識されたddNTPを含むDNA合成系(Dye Terminator法)を利用して、標識されたDNAフラグメントを内径50 µmのキャピラリー管の中で電気泳動を行い、A(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)それぞれの蛍光をCCDカメラで検出し、塩基配列を読み取った。

【0095】

シーケンス用試料の調製にはBigDye(登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied biosystems社)を用いた。反応溶液は、BigDye(登録商標) Terminator mix 1.0 µL、5× Dilution Buffer 3.5 µL、鋳型DNA 200 ng、primer 3.2 pmol、脱イオン水で20 µLにすることで調製された。シーケンス反応は、96℃、1分間後、変性を96℃、10秒間、アニーリングを50℃、5秒間、伸長を60℃、4分間行った。シーケンス産物に、125 mM EDTA 5 µLおよび100% (v/v)エタノール60 µLを加えて混合し、室温に15分間静置後、遠心分離(15,000 rpm、室温、20分間)を行って、上清を除いた。得られた沈殿を70% (v/v)エタノール100 µLで遠心洗浄し(10分間)、上清を除いた。得られた沈殿を風乾し、HiDi™ホルムアミド10 µLを加えてピペティングで溶解した。95℃、2分間変性し、即座に氷中に移した。このようにして精製した試料を、ABI PRISM(登録商標) 310 Genetic Analyzer(Applied biosystems社)を用いて解析し、塩基配列を決定した。(3-8)の項で構築したPrimer in-fusion AscI-Sでは、1種類のプライマーでヒトゲノム断片の両方からDNA伸長が起こるため、シーケンス解析には用いることができない。そこで、ゲノム挿入領域からそれぞれ50 bp程度離れた位置にプライマーを構築し、シーケンスに使用した。

20

30

【0096】

ヒトゲノムを挿入していないp_{BMd2EGFP AscI}を鋳型としたPCRでプライマーに、GFP Cter Asc1 PCR S(5'-acgatcgccctgcagggga-3': 配列番号7)およびAsc1 PCR AS(3'-aattcgaacacgcagatgcag-5': 配列番号8)を用いた場合には135 bp、primer F Bmd2E long(5'-tatgcagtgtgccataacc-3': 配列番号9)およびprimer R Bmd2E long(3'-gggtgccccggaagaata-5': 配列番号10)を用いた場合には268 bpの断片が増幅される。従って、シーケンスで得られた配列を解析に用いる際には、これらの配列を除かなければならない。

40

【0097】

(9-2) 塩基配列解析

シーケンスにより読み取った挿入ヒトゲノム断片の塩基配列について、ヒト染色体上での位置を同定するためにNCBIのHomo sapiens (human) Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP__9606__9558)を使用した。さらに、塩基配列の物理的特性を解析する目的には、次に示すウェブ上のツールを使用した。non-B DB Motif Search Tool (<http://nonb.abcc.ncifcrf.gov/apps/nBMST/default/>)は、塩基配列からB型DNA立体構造以外の構造、例えばクルシフォーム構造やヘアピン構造、Z-DNAといった構造を取りやすい領域を検索するツールである。MARSCAN (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi>

50

-bin/emboss/marscan) は、M A R 活性を示す領域に認められるモチーフ配列 8 b p (aat aayaa) と 1 6 b p (awwrtaannwwgnnc: 配列番号 1 1) とを、2 0 0 b p の範囲内に持つ領域を検索するツールである。SIDD/ZDNA Analysis (<http://benham.genomecenter.ucdavis.edu/sibz/>) は、熱や塩によるストレスより誘導される D N A の不安定化、すなわち Stress-induced Duplex Destabilization (S I D D) を起こしやすい領域を検索するツールである。

【0098】

(10) F I S H 法

F I S H 法は、ある塩基配列に特異的な D N A もしくは R N A プローブを、細胞内の D N A もしくは R N A にハイブリダイズさせた後、蛍光物質によりプローブを可視化させ、それを蛍光顕微鏡下で検出する方法である。この技術は、遺伝子マッピングや間期細胞における染色体分布など、幅広い分野で必須の手法となっている。本実施例では、様々な種類のプラスミドを導入した細胞について、プラスミド配列を F I S H 法により検出した。

10

【0099】

(10-1) 分裂中期染色体標本(メタフェイズスプレット)の調製

各ライブラリー導入細胞の遺伝子増幅の度合いと、コントロールとして作製したヒトゲノム配列を含まない p B M d2EGFP-Asc I をトランスフェクションした C H O D G 4 4 細胞の遺伝子増幅の度合いを比較することを目的として染色体標本を調製した。

【0100】

細胞の固定にはメタノール酢酸固定法を用いた。この方法は、アルコールによりタンパク質を変性させて固定する方法で、ギムザ染色、Gバンド染色、Rバンド染色のほか、F I S H 法により染色体診断など染色体を観察するのに一般的によく用いられる。

20

【0101】

まず、対数増殖期にある細胞培養液 5 ~ 1 0 m L を 1 5 m L 容の遠心管(住友ベークライト社製)に入れて遠心分離(T S ローター、1, 0 0 0 r p m、5 分間、室温、トミー精工 LC06-SS p 遠心機、以下同じ。)を行った後、上清を 2 0 0 μ L 程度残して取り除き、穏やかなタッピングにより完全に懸濁した。次に、3 7 °C に保温しておいた 7 5 m M K C l 溶液を 1 0 m L 加えた。この際、最初の 1 m L は 1 滴加えるたびにタッピングをいくつか徐々に加えた。これを 3 7 °C で 1 0 分間保温した後、4 °C のカルノア固定液(メタノール(ナカライテクス): 酢酸(ナカライテクス) = 3 : 1) を 3、4 滴加え、穏やかに混合した。その後直ちに遠心分離を行い、上清を少量残して取り除いた。得られた沈殿を穏やかなタッピングにより完全に懸濁した後、4 °C のメタノール酢酸溶液を 1 0 m L 加えた。この際、先程と同様に最初の 1 m L は 1 滴ごとに攪拌しつつ加えた。これを氷中で 2 0 分間静置した後、遠心分離を行った。同様の操作を、カルノア固定液を 5 m L、3 m L と繰り返して行い、最後にカルノア固定液 1 m L を 1 滴ずつ攪拌しながら加えた。保存は短期間では氷中、長期では - 2 0 °C で行った。長期保存した場合、使用する際にカルノア固定液を交換した。

30

【0102】

スライドガラス(松浪硝子工業株式会社)への細胞固定は、以下の方法で行った。超純水で十分に湿らせたキムワイブ(日本製紙クレシア株式会社)でスライドガラスを拭き、薄い水の層を作った後、すぐにカルノア固定した細胞溶液 5 0 μ L 程度を数滴滴下した。スライドガラスを十分に乾燥させた後、位相差での検鏡を行い細胞が適切な密度で広がっていることを確認した。細胞が固定されたスライドガラスは、作製から 1 週間以内に F I S H 法に用いられた。

40

【0103】

(10-2) プローブの調製

D I G (digoxigenin) 標識プローブを、BioPrime DNA Labeling System (Invitrogen 社)を用いてランダムプライム法により行った。鋳型となる D N A は、プラスミドを用いる場合は、制限酵素処理で直鎖状 D N A としたものを用いた。鋳型 D N A 2 0 0 n g に、2 . 5 × Random Primers Solution (1 2 5 m M Tris-HCl (pH 6.8)、1 2 . 5 m M M

50

g C l₂、25 mM 2-mercaptoethanol、750 μg/m L oligodeoxyribonucleotide primers (random octamers) を20 μL と、高純水を加えて44 μL にした。熱湯で5分間処理した後、氷中で急冷し、DNA を変性させた。10×DIG DNA Labeling Mixture (1 mM dATP、1 mM dCTP、1 mM dGTP、0.65 mM dTTP、0.35 mM DIG-dUTP (Roche社)) を5 μL 加えて混合した後、Klenow Fragment (large fragment of DNA polymerase I、40 U/μL invitrogen社製) を1 μL 加えてゆっくり混和させ、37 °C で1時間反応させた。反応後、氷中に移し、Stop buffer (10 mM Na₂EDTA (pH 8.0)) を5 μL 加えて反応を停止させた。未反応ヌクレオチドの除去には、High pure PCR cleanup micro kit (Roche社) を付属のプロトコルに従い用いた。精製したプローブ溶液を本実施例において用いた。鑄型となるDNA にはpSFV-V BNを用いた。pSFV-V BNは、CHO DG44細胞に存在しないDNA 配列であるプラストサイジン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、大腸菌複製開始領域を持つプラスミドであり、これをプローブとすることで導入したプラスミドに特異的にハイブリダイズする。

【0104】

(10-3) ハイブリダイゼーション

標本に、終濃度100 μg/mL のRNaseA (シグマ アルドリッチ社) を含む2×SSC 溶液を80 μL 滴下し、その上にカバーガラス (松浪硝子工業株式会社) を被せ、モイストチャンバー内で37 °C、30分間処理した。処理後、カバーガラスを除き、2×SSC で洗浄した。次に70、80、90、100% (v/v) エタノール中でそれぞれ3分間ずつ順に脱水処理を行った。十分に乾燥させ、5~10分間ヒートブロック (DRI-BLOCK DB-3L、エムエス機器株式会社) 上で70 °C まで温めた後、70% (v/v) ホルムアミド (シグマ アルドリッチ社) を含む2×SSC 溶液中で72 °C、2分間処理し、DNA を変性させた。変性の後、すぐに20 °C であらかじめ保冷しておいた70、80、90、100% (v/v) エタノール中で、それぞれ3分間ずつ順に脱水処理を行った。スライドガラス1枚分のハイブリダイゼーション溶液は以下の手順で調製した。FISH用プローブ20 ng に、10 ng/mL Salmon Sperm DNA (GIBCO BRL) を0.7 μL、超純水を加え、20 μL とした。さらに、1/10量の3M 酢酸ナトリウムを加え、十分に混合した後、2.1倍量の100% (v/v) エタノールを加えた。これを-80 °C で30分間静置し、14,000 rpm、15分間遠心してエタノール沈殿を行った。上清を除いて風乾後、超純水3 μL を加え、完全に溶解させ、60% (v/v) ホルムアミド、12% (w/v) Dextran Sulfateを含む2×SSC 溶液を12.5 μL 加えた。その後、75 °C で5分間処理してDNA を変性させた。スライドガラスにハイブリダイゼーション溶液をそれぞれ15 μL ずつ滴下し、22 mm×40 mmカバーガラス (松浪硝子工業株式会社) をのせた。パラフィルムをのせ、標本の乾燥を防ぐためにハイブリパック (コスモ・バイオ株式会社) に入れてポリシーラー (富士インパルス株式会社) で密封し、37 °C で一晩保温した。その後、カバーガラスをスライドガラスから慎重に取り除き、45 °C のウォーターバス (SM-05、タイトック株式会社) 中で、50% (v/v) ホルムアミドを含む2×SSC 溶液で3回、2×SSC で3回、3分間ずつ順に洗うことで、非特異的に結合しているプローブを除いた。

【0105】

(10-4) プローブの検出

非特異的に結合しているプローブを除いた後、ブロッキング溶液 (4% (w/v) Block Ace (大日本住友製薬株式会社)、0.1% (w/v) Tween20 (シグマ アルドリッチ社) を含む2×SSC 溶液) 100 μL をスライドガラスに滴下して37 °C、30分間処理し、シグナル検出のための抗体が非特異的に結合するのを防いだ。次に、一次抗体の終濃度が10 μg/mL になるように調製した溶液 (一次抗体、1% (w/v) Block Aceを含む1×PBS (-) 溶液) を90 μL 滴下してパラフィルムを被せ、モイストチャンバー内で37 °C、60分間処理した。抗体を反応させた後、1×PBS (-)、0.05% (w/v) Tween20 / 1×PBS (-)、1×PBS (-)、1×PBS (1) 中で、それぞれ3分間ずつ順に洗浄し、非特異的に結合した一次抗体を除いた。DIG 標識した

10

20

30

40

50

プローブの検出にFITC-conjugated Anti-DIG, Fab fragments (Roche社)を用いた。プローブの検出を行った後、蛍光褪色防止剤であるVECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR Laboratories社)を用いて $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したPI (propidium iodide)を、スライドガラスに $15 \mu\text{L}$ 滴下し、DNAの染色を行った。22 x 40 mmカバーガラスを気泡が入らないように被せた後、4 で遮光保存した。

【0106】

(11) 蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡はECLIPSE TE2000-U (株式会社ニコン)を用い、60倍の油浸対物レンズ (Nikon Plan Fluor, NA 1.40 oil)によりスライドを観察した。画像の撮影には、CCDカメラ (株式会社ニコン、DIGITALSIGHT DS-QiIMc)を用い、画像の取り込みにはCamera Control Pro2 (株式会社ニコン)を用いた。その後、Photoshop (登録商標) RCS (Adobe Systems Incorporated)により画像処理を行った。

10

【0107】

(12) 電気泳動

DNAサンプルを、1.0% (w/v) アガロースゲル、TAE (Tris Acetate EDTA) 緩衝溶液中で100V、30分間、室温で電気泳動することにより分画した。泳動槽にはMupid (登録商標) - 2X (株式会社アドバンス)、泳動マーカには6 x Loading Buffer (東洋紡株式会社)を用いた。電気泳動後、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide (EtBr) 溶液中で15分間染色した後、紫外線を照射し、FASII (東洋紡株式会社)により写真を撮影した。

20

【0108】

< 2. 結果 >

(1) 1次ゲノムライブラリーの構築

大腸菌DH5 を宿主とした大腸菌1次ゲノムライブラリー6種類 (ライブラリーA, B, C, D, E, F) 構築した。独立コロニーの総数は約230,000個であり、コロニーPCRによりインサートの有無を確認した結果、ヒトゲノム断片が挿入されたプラスミドの割合は約45%で、インサートの平均鎖長はおよそ1.27 kbpであった。この結果から1次ゲノムライブラリー全体で 1.3×10^7 bpのヒトゲノムを含むことになるため、ヒト全ゲノム 3.0×10^9 bpのおよそ4.2%をカバーしていることが分かった。

30

【0109】

(2) 1次ゲノムライブラリーのスクリーニング

ライブラリーAのDNAを導入したCHO DG44細胞を、プラストサイジン存在下で4週間培養することにより安定した形質転換体を選択した。これらについて、FACS Ariaを用いてGFP発現強度を解析し、GFP強度で上位0.5%の細胞2,280個、および上位2.0%の細胞2,280個を、96ウェルプレートに1ウェルあたり1~10個の細胞が入るようにソートした。同様に、ライブラリーBについても同様にした。また、ライブラリーC~Fをそれぞれ導入したCHO DG44細胞を混合した細胞集団より、GFP強度上位0.1%の細胞1,824個、および上位0.3%の細胞2,016個を、96ウェルプレートに1ウェルあたり1~10個の細胞が入るようにソートした。ソートした細胞の入った96ウェルプレートは、さらに3週間程度培養してから、さらに蛍光顕微鏡観察により、GFP発現の高い細胞が増殖しているウェルを選別し、それらを24ウェルへとスケールアップして1週間程度培養してから、6ウェルプレートにスケールアップした。また、GFP発現は中程度であるが、コロニー全体がGFPの発現を示している細胞については5~6個のウェルからまとめて6ウェルプレートにスケールアップして培養した。

40

【0110】

その結果、ライブラリーAより5種類、ライブラリーBより8種類、ライブラリーMix (C~F)より13種類、合計26種類のGFP高発現細胞集団と、GFPが中程度に発現した細胞集団 (「GFP中程度発現細胞集団」)をミックスした4種類の集団を分離

50

した。これらの細胞集団は、それぞれ形質転換で生じた大腸菌一次コロニー 23 万個からなっていた。

【0111】

(3) 2次ゲノムライブラリーの構築

上記で得られた GFP 高発現細胞集団 26 種類と、GFP 中程度発現細胞集団をミックスした細胞集団 4 種類から、ゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、PCR 法によりベクターに挿入されていたヒトゲノム断片を増幅した。この際、5 種類の GFP 高発現細胞集団のゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物からは、電気泳動でバンドが検出されなかった。これはヒトゲノム断片を持たないコントロールベクターが、遺伝子導入時に染色体上で活発に転写されるような領域の近くに組み込まれた結果生じた位置効果により、GFP の高発現を示した形質転換細胞がソートされたためだと考えられた。増幅バンドが検出された PCR 産物を、ベクター p_{BM d2EGFP Asc I} の Asc I サイトに In-Fusion 反応により連結し、大腸菌 DH5⁺ コンピテントセルを形質転換して、大腸菌を宿主とした 2 次ゲノムライブラリーを計 25 種類構築した。それぞれのライブラリーのコロニー数は約 10,000 個程度であった。ランダムに選んだコロニーから、コロニー PCR によりヒトゲノム断片を増殖させ、その平均鎖長を求めると 1.71 kbp であった。1 次ライブラリーの段階ではインサートの平均鎖長は 1.27 kbp であり、これに比べて平均鎖長が長くなっていたことから、スクリーニングにより、発現に影響を与えない短い断片が除かれたことが考えられた。

10

【0112】

(4) 2次ゲノムライブラリー導入細胞の評価

大腸菌 2 次ライブラリーのプラスミド DNA でシングルウェルから回収した GFP 高発現細胞集団 21 種類、および複数ウェルの細胞を混合した細胞集団 4 種類、合計 25 種類、および、コントロールとして用いたベクター DNA (p_{BM d2EGFP-Asc I}) を CHO DG44 細胞に導入し、プラストサイジン存在下で 4 週間ほど培養して得られた安定形質転換細胞について、GFP 発現量を FACS Calibur を用いて測定した。

20

【0113】

その結果、GFP 発現がコントロールよりも高い細胞集団が 6 種類、同程度の細胞集団が 13 種類、低い細胞集団が 6 種類であった。

【0114】

次に (3) で得られた各細胞集団から染色体標本を調製し、FISH 法によりプラスミド配列を検出して、プラスミド配列の増幅構造の形成頻度を間期の核内で評価した。その結果、各ライブラリーで遺伝子増幅構造の形成頻度(「遺伝子増幅頻度」ともいう。)に差が見られたことから、遺伝子増幅構造に影響を与えるヒトゲノム断片がライブラリーに含まれている可能性が示唆された。

30

【0115】

コントロールと比較した GFP 発現の程度および遺伝子増幅頻度を基準にして、2 次ライブラリーを 9 通りに分類した。GFP 発現と遺伝子増幅頻度がともに高まった細胞集団が 3 種類あった。この 2 次ライブラリーの中には遺伝子増幅を促進するようなヒトゲノム配列が存在する可能性が示唆された。また、遺伝子増幅頻度は変化しなかったが、GFP 発現が高まった細胞集団が 2 種類あった。この 2 次ライブラリーには、ヘテロクロマチン化によるサイレンシングを解除するようなヒトゲノム配列が含まれている可能性が期待された。

40

【0116】

(5) GFP 高発現 2 次ライブラリーの再現性

コントロールと比較して GFP 発現が高まった 6 種類の 2 次ライブラリー (Library A9 E3、Library B-3、Library Mix9 G10、Library Mix6 C4、Library Mix9 D8、Library Mix7 F7) と、コントロールのベクター (p_{BM d2EGFP-Asc I}) について、それらの DNA を再度 CHO DG44 細胞へ導入し、約 4 週間プラストサイジン存在下で培養して安定した形質転換体を獲得した。それらの細胞について、FACS Calibur を用いて GFP 発現を

50

コントロールと比較した。

【 0 1 1 7 】

その結果、6種類のうち4種類 (Library A9 E3、Library B-3、Library Mix9 G10、Library Mix6 C4) の2次ライブラリー導入細胞は、コントロールに比べ、発現が顕著に高かった。すなわち、これら4種類の2次ライブラリーでGFP発現が高いという結果の再現性が確認できた。これら4種類の2次ライブラリーを陽性2次ライブラリーと称する。

【 0 1 1 8 】

(6) 陽性2次ライブラリーを構成するヒトゲノム断片のクローン化

前項で同定された4種類の陽性2次ライブラリーDNAを用いて、大腸菌コンピテントセルを形質転換した。この時、4種類の陽性2次ライブラリーのうち、2つ (Library A 9E3、Library Mix 6C4) についてはこれまでと同じ大腸菌DH5⁺のコンピテントセルに形質転換を行った。残りの2つの陽性2次ライブラリー (Library mix9 G10、Library B-3) については大腸菌SURE2のコンピテントセルに形質転換を行なった。これは、これまで用いてきた大腸菌DH5⁺のコンピテントセルでは逆位反復配列やZ-DNAといった不安定なDNAを含むプラスミドのクローニングには適しておらず、そのような配列の取りこぼしが起きていた可能性が考えられた。そこで、不安定な配列のクローニングに適した大腸菌SURE2のコンピテントセルを用いてのクローニングを行った。

【 0 1 1 9 】

大腸菌DH5⁺を形質転換した2つの陽性2次ライブラリー (Library A 9E3、Library Mix 6C4) については、これまでと同様にBlend Taq (登録商標) -Plus- DNA polymeraseを使用して、シングルコロニーを鋳型としたコロニーPCRにより挿入ヒトゲノム断片を増幅した。一方、大腸菌SURE2を形質転換した2つのライブラリー (Library mix9 G10、Library B-3) は、Tks Gflex (登録商標) DNA Polymeraseを使用して、シングルコロニーを鋳型としたコロニーPCRにより挿入ヒトゲノム断片を増幅した。Tks Gflex (登録商標) DNA Polymeraseは、これまで用いてきたBlend Taq (登録商標) -Plus- DNA Polymeraseのような通常のPCR酵素では増幅が困難な、GC-リッチやAT-リッチな領域を含む塩基配列に対するPCR増幅の成功率を向上させたPCR酵素であり、GC-リッチやAT-リッチな領域を含む塩基配列の取りこぼしを減らすことが期待して、今回から用いた。

【 0 1 2 0 】

上記のようにして得られたPCR産物を電気泳動にすることにより、増幅されたヒトゲノム断片のバンドを確認した。一方、同じ鎖長の塩基配列は電気泳動では区別することができないため、4塩基認識の制限酵素Sau3AIを用いてPCR産物を消化し、電気泳動を行うことも行った。その結果得られた塩基の鎖長と、その全コロニーに占める割合を計測した。

【 0 1 2 1 】

その結果、Library A9 E3から6種類の、Library Mix6 C4から2種類の、Library Mix9 G10から5種類の、Library B-3から8種類の、それぞれ異なるヒトゲノム断片を持つクローン化プラスミドDNAが得られた。これらのプラスミドを持つ大腸菌を、それぞれ大量培養し、クローン化プラスミドDNAを精製した。

【 0 1 2 2 】

(7) クローン化ヒトゲノム断片導入細胞のGFP発現

前項で得られた、Library A9 E3由来の6種類のプラスミド、Library Mix6 C4由来の2種類のプラスミド、Library Mix9 G10由来の5種類のプラスミド、Library B-3由来の8種類のプラスミド、及びコントロールのベクター (p BM d2EGFP-Asc I) をそれぞれCHO-DG44細胞へ導入し、約4週間プラストサイジン存在下で培養して安定した形質転換体を獲得した。これらについてFACS Caliburを用いてGFPの発現強度を解析し、コントロールと比較した。

【 0 1 2 3 】

その結果を図5に示す。図5 (a) および (b) はLibrary B-3 3926 31 3.0 kbpが導入

10

20

30

40

50

された細胞、およびコントロールのベクターが導入された細胞のそれぞれのGFP強度を示すヒストグラムを重ねて表示したものであり、図5(a)はLibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合、図5(b)はコントロールのベクターが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合である。図5(a)および(b)において、コントロールのベクターが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムよりも、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムの方が右側にシフトしていることから、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞においてGFP強度が高い細胞数が増えていることが分かる。よって、LibraryB-3由来の3.0 kbpのヒトゲノム断片を含むプラスミドDNA (LibraryB-3 3926 31 3.0 kbp) が導入された細胞は、コントロールのベクターが導入された細胞と比較してGFPの発現量が高いことが分かった。

10

20

30

40

50

【0124】

同様な実験を独立してさらにもう2回行い、コントロールとのGFP強度の比較を行った。その結果、LibraryB-3由来の3.0 kbpのヒトゲノム断片を含むプラスミドDNA (LibraryB-3 3926 31 3.0 kbp) は、独立した計3回の実験で、再現性良くGFP発現量の増強効果が見られた(図5(a)~(f)を参照のこと)。図5(c)および(d)はLibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞、およびコントロールのベクターが導入された細胞のそれぞれのGFP強度を測定した再現実験(1回目)の結果であり、図5(c)は、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合、図5(d)はコントロールのベクターが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合である。図5(e)および(f)はLibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞およびコントロールのベクターが導入された細胞のそれぞれのGFP強度を測定した再現実験(2回目)の結果であり、図5(e)は、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合、図5(f)はコントロールのベクターが導入された細胞のGFP強度を示すヒストグラムを前面に表示した場合である。

【0125】

また、CHO DG44細胞に代えてCOLO 320DM細胞を用いて上記と同様な実験を行ったところ、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpが導入された細胞の方がコントロールのベクターが導入された細胞よりもGFP強度が高かった。しかも、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpのGFP発現量の増強効果は、CHO DG44細胞を用いた場合よりも顕著であった(データは省略する。)

【0126】

(8) LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpを導入したCHO DG44細胞の遺伝子増幅
LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpを導入したCHO DG44細胞の染色体標本を作製し、プラスミド配列をプローブとしたFISH法により、プラスミド配列の増幅構造を観察した。

【0127】

その結果、コントロールとの間で、遺伝子増幅構造の形成頻度に大きな差は見られなかった。このことから、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpは遺伝子増幅を促進する作用ではなく、増幅した遺伝子からの発現を増強する働きを持つことが示唆された。

【0128】

(9) ヒトゲノム断片 (LibraryB-3 3926 31 3.0 kbp) の塩基配列
コントロールと比較して再現性良くGFP高発現が確認できたLibraryB-3 3926 31 3.0 kbp中のヒトゲノム由来の塩基配列をABI PRISM (登録商標) 310 Genetic Analyzer (Applied biosystems社) を用いて決定した。その結果、両末端から約300bpの塩基配列が得られた。この配列を用いて、ヒト染色体上で相同性が高い領域を、NCBIのHomo sapiens nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) で検索したところ、ヒト2番染色体上の3,271bp (位置番号57,315,359 から 57,318,630) のDNAであることが分かった(図1を参照のこと)。この鎖長は、LibraryB-3 3926 31 3.0 kbpの

アガロースゲル電気泳動での結果と良く一致していたことから、間違いないと判断した。

【0129】

この塩基配列についてウェブ上の遺伝子解析ツールnon-B DNA Motif Search Toolを利用して解析を行った。この塩基配列はGC含量32%、AT含量68%と塩基配列の分布に偏りがあり、9つのInverted repeat、1つのMirror repeat、1つのG-Quadruplex forming repeat、1つのSINE elementを含んでいることが分かった。また、MARSCANを用いた解析では2,275bp~2,293bpの間にMARが存在することが示唆された。また、SIDD/ZDNA Analysisを用いた解析では1,500bp付近と1,800bp付近にStress-Induced Duplex Destabilizationを受けやすい不安定な領域が存在することが示唆された。また、染色体上で付近に遺伝子が存在するかを確認したところ、偽遺伝子が40kb

10

【0130】

<3.考察>

(1) IR/MAR遺伝子増幅法の増幅遺伝子の発現を増強させるヒトゲノム配列

本実施例で、IR/MAR遺伝子増幅法で増幅させた遺伝子からの発現を増強させるヒトゲノム配列をスクリーニングした結果、2次ライブラリーLibraryB-3に含まれていたクローン3926-31の3.0kb断片が、所望の配列として単離された。このような発現増強効果は、3回の独立した実験で、再現性が得られた。この配列の存在により、IR/MARプラスミドによる増幅構造の形成自体には変化がなかったことから、このヒトゲノム配列(「B-3-31」)は、遺伝子増幅の過程には影響を与えず、増幅された遺伝子からの発現を高める配列であることが示唆された。

20

【0131】

このヒトゲノム断片の塩基配列を決定し、公開されているヒトゲノム配列に対してBLAST検索を行ったところ、ヒト2番染色体短腕バンド2P16.1にある3,271bpの塩基配列であることが判明した。この塩基配列は、全体としてGC含量32.2%、AT含量67.8%と塩基配列の分布に大きな偏りがあった。ヒト2番染色体上で、ランダムに3,200bpの領域を50箇所選択し、それぞれのAT含量を計測した結果、B-3-31の配列のAT含量は最も高かった。このような高AT含量の領域は、3,271bpの領域全体に及んでいたが、特に塩基番号1,400~1,800の領域はAT含量76.0%と極めてAT含量が高い領域であった。

30

【0132】

一方、このB-3-31をnonB-DNA motif search toolで解析したところ、9つのInverted repeat(6~8塩基のリピートで中央に0~4塩基のスペーサーを含む。)、1つのG-Quadruplex forming repeat、1つのSINE elementを含んでいた。また、SIDD/ZDNA analysisで解析したところ、環境ストレスにより2本鎖構造が変性するStress-Induced Duplex Destabilization(SIDD)領域が1,500bp周辺と、1,900bp周辺に存在することが示唆された。さらに、MARSCANによる解析で、1つのMAR/SAR recognition siteが予測された。さらに、NCBI Map Viewerを用いて2番染色体上の遺伝子を持つ領域を検索し、染色体上のこの配列近傍に遺伝子が存在するか否かを検討した。その結果、この遺伝子は遺伝子の少ないサブバンドに局在していたため、タンパク質をコードしている遺伝子は周辺1Mb以内には存在せず、およそ40kb上流に偽遺伝子が存在するのみであった。このことから、エンハンサーのように、何らかの遺伝子の近傍で働いている配列ではないことが示唆された。

40

【0133】

このようなB-3-31の特徴を、代表的な(1)複製開始領域、(2)MAR配列、および、(3)プロモーター配列について、同じ解析ツールを用いて同様な検討を行い、相互に比較した。すなわち、(1)複製開始領域として、DHF R遺伝子座由来IR配列、c-myc遺伝子座由来IR配列、-globin RepP由来IR配列、(2)MAR配列として、Ig遺伝子のイントロン由来の強力なMARを含むAR1配列、および、(3)プロモーター配列として、EF1aプロモーター配列について解析を行って比較検討した。そ

50

の結果、本研究で得られた B - 3 - 3 1、(1) の複製開始領域 3 種、(2) の M A R 配列 1 種について、SIDD site と inverted repeat が隣接して存在する領域が共通して存在した。3 つの I R 配列についてのこのような領域は、発明者による M A R Finder program を用いた解析の結果、M A R 活性を持つ領域として予測された配列 (D H F R 遺伝子座由来 I R の 1 , 9 0 0 ~ 2 , 8 0 0 b p、-globin RepP 由来 I R では 8 0 0 ~ 1 , 6 0 0 b p、c - m y c 遺伝子座由来 I R では 5 0 0 ~ 9 0 0 b p) と一致した。よって、B - 3 - 3 1 に存在する、1 , 4 0 0 ~ 1 , 5 0 0 b p の間と、1 , 8 0 0 ~ 1 , 9 0 0 b p 間に存在する SIDD site と inverted repeat とが隣接して存在する領域は、M A R 活性を示す可能性が示唆された。

【 0 1 3 4 】

(2) スクリーニング方法

本実施例では、ヒトゲノム D N A のスクリーニングにおいて、通常の大腸菌 (D H 5) を宿主としたライブラリーの構築と、通常 P C R 酵素 (Blend taq (登録商標) -Plus-) によるヒトゲノム領域の増幅を行なった。大腸菌を用いたプラスミド D N A のクローニングでは、Inverted Repeat や Z - D N A などの二次構造を作りやすい配列を含んでいる場合、大腸菌の修復システムにより組み換えられたり、削除されたりしてしまうことがある。また、P C R 法による D N A の増幅においても、A T - リッチや G C - リッチな配列や、Inverted Repeat の増幅は困難である。一方、発現を促進するプロモーター配列や M A R 配列には A T - リッチな領域や二次構造を作りやすい配列が含まれていることが多く、これらの配列を取りこぼしている可能性が考えられる。

【 0 1 3 5 】

今回はスクリーニング実験の終盤にあたるシングルプラスミド単離の段階で、4 つのライブラリーの内、3 つについては大腸菌と P C R 酵素とを変更して実験を行った。大腸菌は D H 5 のコンピテントセルから、S U R E 2 のコンピテントセルに変更した。S U R E 2 は不安定な D N A のクローニングに適した大腸菌で、U V 修復システムの遺伝子と、S O S 修復システムの遺伝子を削除することで長い反復配列を持つ D N A のクローニング効率を向上させている。P C R 酵素は Blend taq (登録商標) -Plus- DNA Polymerase から Tks Gflex (登録商標) DNA Polymerase に変更した。Tks Gflex (登録商標) DNA Polymerase は G C - リッチや A T - リッチなどの通常 P C R 酵素では増幅が困難な鑄型からの増幅も成功率が著しく向上した P C R 酵素である。本実施例では、大腸菌と P C R 酵素とを変更して行われたスクリーニングによって、所望の活性を有する B - 3 - 3 1 を見出すことに成功した。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 6 】

上記説示したように、本発明によれば、I R / M A R 遺伝子増幅法によって形成される目的遺伝子の反復配列に起因する遺伝子発現抑制の問題点を解決することができ、所望のタンパク質を高発現させることが可能となるという効果を奏する。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可能になるという効果を奏する。

【 0 1 3 7 】

したがって、本発明はタンパク質の生産を行う産業、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。

10

20

30

40

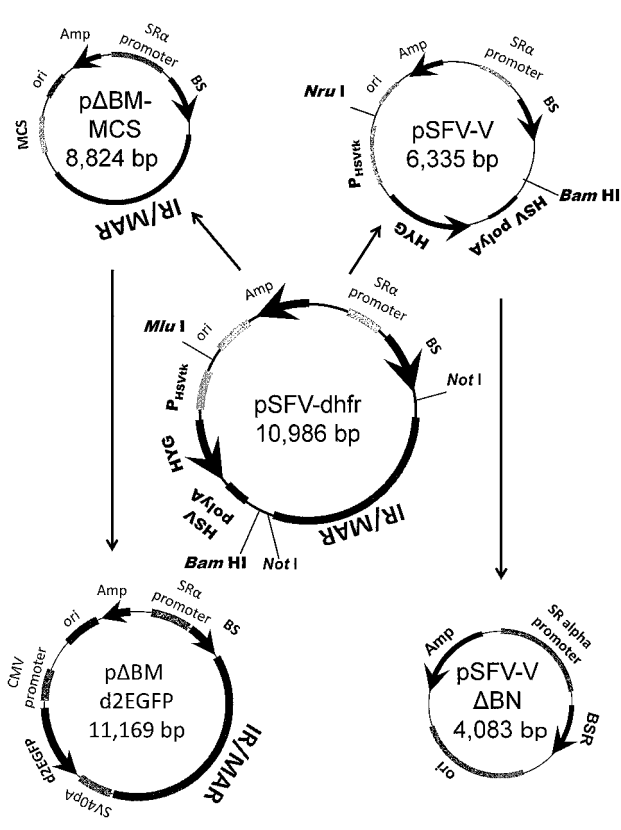
【 図 1 】

図 1

AAATACCTACACTCTGCAGTAATCTCCCTGGAACGCTGCAGAACATACATATGTGATTT
 TGCACTAGCTTAATTTGAATTTCTTAGAAATACATGAAATCAAATATATATCTCCTTTGTGTC
 AGCTTTTTCAGTATATAGTGTGTTGGAGATCTATGATGCTGTCATGATTTGTTGGGTTAT
 AATTTTATGATAATAGTATCAAAATGATATCTATACATCCTATGATGTCATTTACTGTGTC
 TTGATTTGGATATGACAAATAAAGTTACTAGAACATATGATACATGCTCTCTGTACATATTTTA
 AAAATGTACTTAAAGTGTGCTGTTTGGAGCCATTAATGAAATGAAATTTATTTGTGATTTT
 ATTTGGTACTATATGATGCAATTTGTGAAAGTAATTTAAGTACTGCTGCTGTGCAACACACT
 AATTTTAGTACCTTTTTTGGGCTTGGTAAAGTTTTCGATTTATAAAAAGTGTACTGCAAAAAGA
 AAAATAAAATGACTTCTTTGACAAGCTGATATAATGTAATTTGTCAAATTCATTTGCTAAGT
 ACAGTGGTAAAGCCCTTTACAATGTGCAATAGCAGGCAAGTGTGACATCCTAACTGTTATAAAA
 TTTTAGTGGAAAGATACAGATTTTGGCATTAGGCGCTAGTTTGTGTTTATCAAATGCGCTTATT
 AGCTGATGAAATTTCTCTATGCTTAGTTTGTATAAATGAATGTTGAATTTGTCAAATGCTTTCTGC
 ATCAAATGTAATCATTATATGTTTATTTGATTTCTGTTTATATGTTGAAATGTTGAATGTTGCT
 TAAATAAACTTTACTGGTAAATAGATAGCATGTTTATCTGTGGGACTAATTTACTAGGATTTCT
 TTTTTTAAATATACTTTAAGTTTAGTACATGTCGCCAACAATGCGGATTTGTTTCAATATGATAC
 ATGTTGATGTTGGTGTGCTGCAACCCAGTAACTGCTGATTTAATAGTATGTTATCTCCAAATGCTGCTC
 CTCCACTCCGCCACCCACACAGGCCCGGATGGAATGAAATGAAACATGAGAACATGGACACAG
 AAGGGAACTACTAGTATTTCACTAGGAATTTACTGTTGCTTTAAAGCATATTTGGCTATAGT
 TTCTCTATAACATCGTCTGTTTGGTGCAGACAGCAGCTAATGGCCCTATAAATGAGTTGGGAA
 GTGTTCTTCTTAAATACAGTACAGCATTTAGTCAACATGAATGCTAAATATTTAGTCTTTT
 GGAATTTCAATGATTTTAAATAAATATATGACAAATTTGGTCTCAGTATTATTTCTTAATA
 CACTACTGATTTGCTAACATTTCAATAAATTTTAACTTTGTAATCAGTAAAGATTGAAATC
 AGTCTCTTTTGGACATAAATTTCTGTTTCTATATAAAGTAAATTTGCTTAAAGTAAAGT
 GTTTTCTCTTACATAAATGAGGTTTACAGCAGAAATTTATATGTAATAAATTTCTCTGTA
 CATAGATTTAGTTTGGCATGCTCTTATTTCTGATTTGATATTTCTCTTTGATTTCTCTTTGA
 TCGAATTTGATGTCATTTAAATCATTAATATGATTAATTTTAAAGCAATTTGAAATAA
 CTTTCTTGACCACAGGTTGCTGTAATAAGCACAATTTGCACTGGTAAATGTTGTTTCAAT
 ACATGGTACATTTATTTGCTGTTCTGTTTGTCTTTTGGACACAGTCTCACTGTGTCAGCCAGT
 TGGAGTTCAGTGGATGAACTTGGCTGCTGCAACCTGCTGCTGGTTCAAGGATTCCTGCTGCTC
 AGCTCCCGAGTACGTTGGGATACAGGCCACACACAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 AGCTGGGTTTGGCAGTGGGCAAGCTGCTGCAACTCCTAGCTAAAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCT
 ACCAAAGTCTGGGATCAGGCGATGAGCCACTGCACCTGGGCGATGTTCAATTTTGTAAAGTTTAA
 ATATGTTAAACAGTAAATATATTTCTCTATAAATAAAGATGATCCATGTTGTTAATTTAA
 GATTTATGATATTAATCACTAATTTGTTTACATTTCAACTCTTTTCTGATCAGGCTATGAAAT
 TGAGCAAGAAATGAGAACTCTAGAAATTTCAACAAATGTTTCAAGGATGATCATTTTTCTCACTC
 CAGCTGGGAACCTGGTAACCCCTTGAATATGGAGCTCCCATTTTCTCAGTAAGACAAATTTCT
 TCTATATTTGTTAAATATAGCTCTGCTACCTGTTTATTTATATTTATACATGAATTTATG
 ATCCTGGCATCTTTATATGCTGCAACCTGTTTCAATGATTTCTTTTGTGCTTTGCTTTGGAAG
 TATTTATGCTCTAATTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 TATTTTGTAAAAAATTAAGTTTAAATTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 ATGCTTATGTTTATGTTAAATTTAATTAACAAGTTTATAGATTTGATGTTTAAAGTGGAGATA
 AAATAAATTTGATGAAATTAAGAAAGGGAACAGCAATGCAATTTCAAGACTAAATACTTAGGA
 AAAAGGAAATTAATCAATGTAATCTATAGAAATGGGATTTGATAGTATCAACATCAAATGCAAAAAG
 CTAGAGGCTATATGTTGAAATTTCTATGAGCAAGTTTAAAGAAATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GAATGGAGTCAATTTGATTTGCAAGGCTGCTCACTTAAAGAAATACAGAAATGCTCAGGATATGGAAT
 TTTCTAATGATAGCAACAGGCTGGAACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 ACTAACTCAAATATGATTTCTGAGAAATTAAGGCTCTGATGATCTG

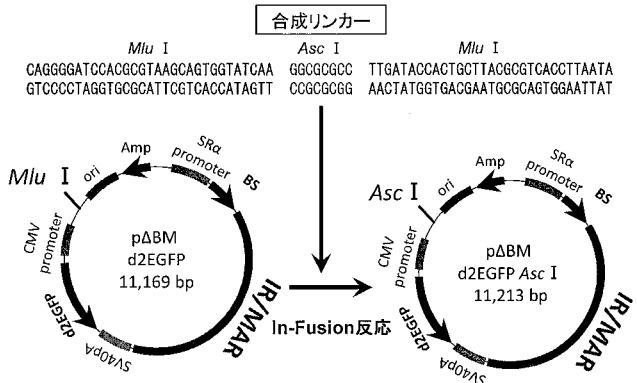
【 図 2 】

図 2



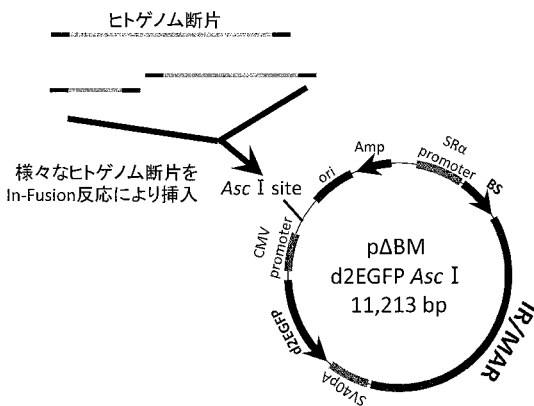
【 図 3 】

図 3



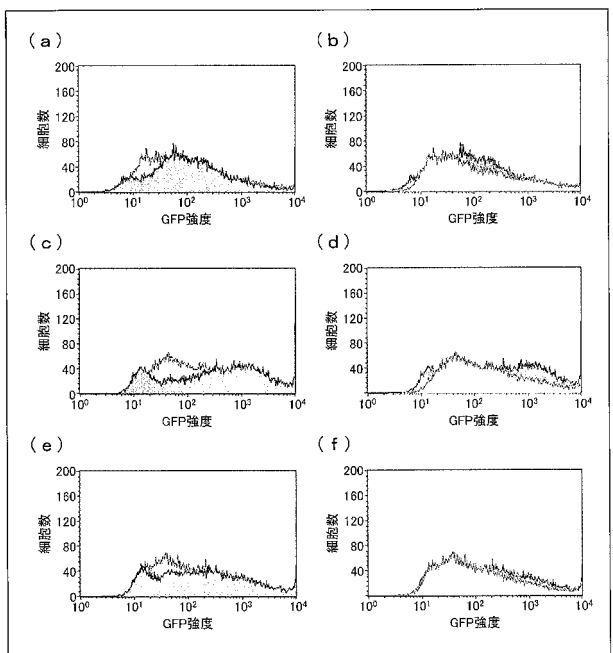
【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

図 5



【配列表】

2016127817000001.app