動物細胞による蛋白質生産†

佐々田玲子, 垣沼淳司

(武田薬品工業株式会社研究開発本部生物工学研究所)

動物培養細胞は、動物の組織で産生される各種の生理活性蛋白質を生産するための優れた素材である。細胞培養技術の著しい進歩により、各種組織や血液から得られる正常細胞または癌細胞を株化し培養液に適当な細胞増殖因子類を添加することによって、有用蛋白質を生産する細胞の培養が可能となった¹⁾。

正常細胞は、培養系に移した場合一定の培養期間を超えると死滅する性質があり、そのままでは生産のための素材に用いることが困難なので、これを株化する必要がある。株化細胞とは、遺伝子レベルの変化により長期にわたる継代培養が可能となった不死化細胞で、癌組織由来細胞の培養、癌ウイルスや化学発癌剤による正常細胞のトランスフォーメーション、細胞の不死化に関与するオンコジーン²⁾の導入、株化された癌細胞との細胞融合などの手法を用いて樹立することができる。癌患者の組織や血液から樹立された細胞株には、組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA)、インターフェロン類、インターロイキン類、コロニー刺激因子 (CSF) などを産生するものがあり、また、細胞融合により得られるハイブリドマを用いたモノクローナル抗体の生産は、すでに実用段階にある。

しかし、これらの手法により生産できる蛋白質は、使用する細胞が本来産生している蛋白質に限られ、一方で育種や培養条件の改良によって向上させうる蛋白質の生産性にも限界がある。

1970年代に確立された組換え DNA 技術は、本来動物体内で合成されている微量の生理活性蛋白質を大腸菌などの微生物を宿主として大量に産生させることを可能

とした。生産性の面から見ると大腸菌は優れた宿主であるが、大腸菌には蛋白質への糖鎖付加機構がないため大腸菌を用いて生体蛋白質の多くを占める糖蛋白質を生産することは不可能であり、さらに、分子内に多数のジスルフィド結合を持つ蛋白質の場合には、これらが変性状態で菌体内に蓄積するため、正しい高次構造を保持した活性のある蛋白質として取得するのが困難である。これらの欠点を克服するために、動物細胞を宿主として用い、目的とする生理活性蛋白質の遺伝子を導入、発現させて遺伝子産物を得る生産系が開発されてきた。この系は、本来の産生細胞を用いる場合に比べ、宿主として用いる細胞を目的に応じて選択できること、DNA レベルで発現を改良することにより生産性を高めることができること、天然型蛋白質の構造を変えた改変型蛋白質を生産できることなどの種々の利点を持っている。

本稿では、この組換え DNA 技術を用いた動物培養細胞での生理活性蛋白質生産系について、とくに発現ベクターと遺伝子増幅の問題を中心に述べる。

1. 動物細胞用発現ベクター

動物細胞には、大腸菌におけるプラスミドベクターのような確立された系がないため、外来遺伝子を効率よく発現させることを目的として、さまざまな宿主-ベクター系の開発が試みられてきた。たとえば、シミアンウイルス 40 (SV 40) ベクターとサル腎由来 COS 細胞を用いる宿主-ベクター系は、SV 40 DNA の複製開始点を持つベクター DNA が宿主の染色体に組み込まれることなく細胞中で多数複製され、発現効率が高いので、cDNA ライブラリーのスクリーニングや遺伝子産物の同定などによく用いられる。しかし、この系は発現が一過性であるという欠点を持っており、生産のための系としては適さない。動物細胞に外来遺伝子を導入、発現させて有用蛋白質を大量に取得するためには、導入されたベクターが細胞内に安定に保持され、遺伝子の発現が持続して起こるような細胞株を得ることが必要である。このための

† Production of Recombinant Proteins with Mammalian Cells.

Reiko SASADA and Atsushi KAKINUMA (Biotechnology Research Laboratories, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Yodogawa-ku, Osaka 532)

Fig.1. Effects of Various Promoters on IL-2 Production in Mouse L Cells and Human FL Cells. IL-2 producing clones were distributed based on the IL-2 productivity. □, <0.01 U/ml; ▨, 0.01 to 0.1 U/ml; ▩, 0.1 to 1.0 U/ml; and ■, >1.0 U/ml of IL-2 activity. *One unit corresponds to 350 Japan Reference Units (JRU).

方法としては、宿主細胞染色体に導入遺伝子を組み込ませる方法と、ウイルス性のレプリコンを利用したエピソーム型ベクターを用いる方法とがある。

いずれの方法においても、本来のプロモーター領域やイントロンなどを含むゲノム DNA の場合はそのままの形で遺伝子を発現させるが、cDNA を用いる場合は、導入遺伝子を効率よく発現させるための強力なプロモーターとともにスプライス部位やポリ A 付加シグナル部位をもつベクターを用いる必要がある。強力なプロモーターとしては、レトロウイルスの LTR 領域、SV 40 やサイトメガロウイルスなどのプロモーター領域、誘導可能なメタロチオネイン遺伝子プロモーターなどがよく用いられている。

プロモーターによる遺伝子の発現効率、宿主細胞の由来する動物の種や組織の違いによってかなり変動する(種特異性、組織特異性)。われわれが数種のウイルス由来プロモーターを用いて IL-2 cDNA をマウス L 細胞とヒト FL 細胞で発現させた際に認めた種特異性の例⁽²⁾を、Fig.1 に示す。各種発現ベクターを導入して得られた形質転換細胞を培養し、培養液中に産生された IL-2 活性を測定した結果、IL-2 産生量の多い細胞株の得られる頻度が最も高かったのは、マウス L 細胞ではマウス白血病ウイルス (MuLV) LTR をプロモーターとした場合であったのに対し、ヒト FL 細胞ではヒト T 細胞白

血病ウイルス (HTLV) LTR をプロモーターとした場合であった。プロモーター領域やイントロンには、遺伝子の転写効率の上昇や組織特異的な発現に関するエンハンサー配列の存在することが知られており、互いに異なる遺伝子からのプロモーター領域とエンハンサー配列を組合せたベクターも作製されている⁽³⁾。

導入遺伝子が組み込まれた細胞を選択する手段としては、マーカー遺伝子が用いられる⁽⁴⁾。マーカー遺伝子のうちでは、DNA 合成にかかわるチミジンキナーゼの遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の遺伝子などがよく用いられるが、これらの遺伝子を用いる場合には、それぞれの酵素の欠損した細胞株が必要となる。これに対して、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子などではその必要がないので、汎用性の高いマーカー遺伝子として種々の細胞で利用できる。一般に、導入遺伝子が組み込まれる染色体上の部位や組み込まれた遺伝子のコピー数は一定しておらず、発現効率はこれらの要因に大きく左右されるため、マーカー遺伝子を用いて選択された細胞のなかから産生量の高い細胞をクローン化する必要がある。

エピソーム型ベクターの代表例はウシパピローマウイルス (BPV) ベクター⁽⁵⁾で、細胞当たりのコピー数が多い (20~100 コピー) ため高発現が期待できるが、導入

遺伝子の安定性に問題がある。最近, EB ウイルスのレプリコンを用いたベクター⁽⁶⁾や, L 因子を用いたベクター⁽⁷⁾も報告されている。BPV ベクターを用いてヒト蛋白質を産生させた例としては, インターフェロン類, インターロイキン類, 絨毛性ゴナドトロピンなどがある⁽⁸⁻¹⁰⁾。

2. 遺伝子増幅

一般に, 導入された外来遺伝子 DNA が宿主細胞染色体に組み込まれる頻度は低く, しかも組み込みはランダムに起こる。遺伝子の組み込まれた細胞を適当な選択マーカー遺伝子を用いてクローン化したのち, 人工的に遺伝子増幅を起こさせてコピー数を上げることにより高産生細胞株を得る手法がある⁽¹¹⁾。これらのうちでは, DHFR 欠損 CHO 細胞から DHFR 陽性細胞を得たのち, メトトレキサート (MTX) 存在下に培養して耐性細胞を得る方法が最もよく用いられている。

われわれが DHFR 遺伝子を持つ IL-2 cDNA 発現ベクターを構築して遺伝子増幅を検討した例⁽²⁾を, Fig. 2 に示す。プラスミド pTB 485 はヒト IL-2 遺伝子のプロモーターとして MuLV LTR を持ち, さらに同一プラスミド上に DHFR 遺伝子を持つ。このプラスミドを DHFR 欠損 CHO 細胞に導入して得られた IL-2 産生細胞株 (DHFR⁺) を MTX 存在下に培養し, 得られた耐性細胞株の IL-2 産生量を親株と比較した。この耐性株培養液中には 120 U (4×10^4 JRU, 3.5 μ g)/ml の IL-2 が産生され, 生産性は親株に比べて約 15 倍に上昇していた。

DHFR 遺伝子を増幅させて得られる MTX 耐性細胞には, 耐性遺伝子が double minute chromosome と呼ばれる小型染色体様構造体として核内に多数現れる不安定型と, HSR (homogeneous staining region) として通常の染色体上で比較的安定な形で増幅しているものがあり, 後者をクローン化することによって安定な産生細胞を得ることが可能である。有用蛋白質の取得を目的とする場合には, 従来からこの CHO-DHFR 系が最も頻度高く用いられてきており, tPA, エリトロポエチン, β および γ -インターフェロンなどについて多くの報告例がある⁽¹²⁻¹⁵⁾。

クローン化された遺伝子を導入することにより, 有用蛋白質を数 10 mg/l まで産生できる組換え細胞株が得られてきているが, 実用化を考えるとときにはこの程度の生産性ではまだ不十分であり, さらに高発現用ベクター系

Fig. 2. (A) pTB 485, an Expression Vector for Human IL-2 cDNA. (B) Production of Human IL-2 by C-IL 485-4 Cells (DHFR⁺, parental clone) and C-IL 485-14 Cells (MTX resistant). *One unit corresponds to 350 JRU.

の開発が必要である。最近, SV 40-メタロチオネイン遺伝子プロモーターを用い CHO 細胞で 200 mg/l の成長ホルモンを産生させた例が報告された⁽¹⁶⁾。

蛋白質の生産のためには, 以上に述べたベクター側の問題に加えて, 宿主細胞側の問題を考慮する必要がある。

蛋白質生産用の宿主に動物細胞を用いることの最大の利点は, 糖蛋白質の生産が可能となることである。糖蛋白質の糖鎖の生理的意義については, 絨毛性ゴナドトロピンなどのように糖鎖が活性そのものにかかわっている場合と, エリトロポエチンや G-CSF のように生体内でのクリアランスにかかわっている場合とが知られている⁽¹⁷⁾。糖鎖が重要な意味を持っている糖蛋白質を生産するためには, 動物細胞を宿主とすることが最も望まし

い。しかし、遺伝子が導入された動物細胞で産生される糖蛋白質の糖鎖構造は、使用する宿主細胞の違いによって異なってくる場合があり⁽¹⁸⁾、ヒトエリトロポエチンでは、天然型と異なる糖鎖の付加が生理活性に影響すると言われている⁽¹⁹⁾。

したがって、今後は、DHFR 以外にも、より汎用性の高い遺伝子増幅系や安定性の高いエピソード型ベクター系を開発することが必要となる。また、ハイブリドーマの親株として用いられているミエローマ細胞のように、浮遊培養が可能で分泌能の高い細胞を宿主細胞として使ってゆくことも必要となろう。

動物培養細胞による蛋白質生産には、樹立した高産生細胞株の高密度培養技術や無血清培養技術が不可欠である。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の生産を通して大幅に進展したこれらの技術が適用されることにより、遺伝子導入動物培養細胞は糖蛋白質を中心とする生理活性蛋白質の生産のための中心的役割を担うようになってゆくものと思われる。

- (1) 杉野幸夫編：「細胞培養技術」，講談社サイエンスティフィク，1985。
- (2) R. Sasada, H. Onda and K. Igarashi: *Cell Struct. Funct.*, **12**, 205 (1987).
- (3) 武部 豊：実験医学，**7**, 94 (1989).
- (4) C. Gorman: "DNA Cloning," Vol. 2, ed. by D. M. Glover, IRL Press, 1985, p. 143.
- (5) M. S. Campo: "DNA Cloning," Vol. 2, ed. by D. M. Glover, IRL Press, 1985, p. 213.
- (6) J. L. Yates, N. Warren and B. Sugden: *Nature*, **313**, 812 (1985).
- (7) K. Nishimori, T. Kohda, J. Fujiwara and M. Oishi: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2097 (1988).
- (8) H. Karasuyama and F. Melchers: *Eur. J. Immunol.* **18**, 97 (1988).
- (9) R. Fukunaga, Y. Sokawa and S. Nagata: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5086 (1984).
- (10) T. V. Ramabhadran, B. A. Reits and D. C. Tiemeier: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6701 (1984).
- (11) C. R. Bebbington and C. C. G. Hentschel: "DNA Cloning," Vol. 3, ed. by D. M. Glover, IRL Press, 1987, p. 220.
- (12) R. J. Kaufman, L. C. Wasley, A. J. Spiliotes, S. D. Gossels, S. A. Latt, G. R. Larsen and R. M. Kay: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1750 (1985).
- (13) J. S. Powell, K. L. Berkner, R. V. Lebo and J. W. Adamson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6465 (1986).
- (14) S. J. Scahill, R. Devos, J. V. Heyden and W. Fiers: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4654 (1983).
- (15) F. McCormick, M. Trahey, M. Innis, B. Dieckmann and G. Ringold: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 166 (1984).
- (16) J. S. Friedman, C. L. Cofer, C. L. Anderson, J. A. Kushner, P. P. Gray, G. E. Chapman, M. C. Stuart, L. Lazarus, J. Shine and P. J. Kushner: *Bio/Technol.*, **7**, 359 (1989).
- (17) 西川義尚：細胞工学，別冊 **4**, 23 (1988).
- (18) 内海 潤：実験医学，**6**, 79 (1988).
- (19) M. Goto, K. Akai, A. Murakami, C. Hashimoto, E. Tsuda, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, A. Ishimoto, H. Chiba and R. Sasaki: *Bio/Technol.*, **6**, 67 (1988).