

## 4

## 哺乳動物細胞

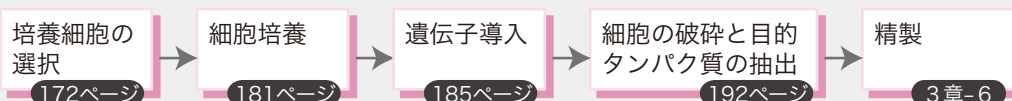
村野健作, 加藤広介

## 特徴

※ 詳細は 2章-1,5 参照

- ・ 翻訳後修飾を受けた目的タンパク質を調製できる。
- ・ 生化学的活性を保持していることが期待できる。
- ・ 発現させる細胞をさまざまな細胞種から選べる。
- ・ 大腸菌と比べて高価な発現系であり、収量は少ない。
- ・ 細胞内における目的タンパク質の機能を解析できる。

## 実験フローチャート



## 1 培養細胞の選択

研究対象であるタンパク質を発現させる細胞の選択は、実験目的に大きく依存する。実験に用いる細胞株によって研究の成否が決まる。細胞種や組織依存的な翻訳後修飾を受けた目的タンパク質を産生させ精製するためには、該当する培養細胞を選択する必要がある。本項では実験の目的に応じた細胞株の選択について解説する。

## 1 普遍的な細胞機能の解析 (表1)

細胞周期、DNAの複製反応や細胞骨格など、すべての細胞が備える機能を研究の対象とする場合、基本的にはどのような細胞種でも構わない。ただし、安価な培地で容易に培養が可能、培養操作などの物理的力に耐性が高い、高効率なDNAの導入方法が確立しているなどの理由でHeLa細胞がよく用いられている。また、HeLa-S3細胞は浮遊培養が可能で、増殖速度も速いことから目的タンパク質の大量産生によく用いられている。同様の理由からCHO細胞もタンパク質産生に用いられる細胞株である。インターフェロンやエリスロポエチンなどのサイトカインの組換え体産生に用いられており、目的タンパク質の大量生産も行われている。高効率なDNAの導入が可能な細胞としてHEK293細胞もよく用いられている。またSV40 large T抗原を組込んだ293T細胞では、SV40複製起点を搭載したプラスミドベクターからの遺伝子発現量の増加が期待される。

表1 普遍的な細胞機能の解析に用いられる細胞株

細胞株名	由来	増殖形態	特徴	理研細胞バンク
HeLa (-S3)	ヒト子宮頸がん	付着／浮遊	ヒト細胞ではじめて株化された細胞，大量培養が容易なため生化学実験に用いられてきた。派生株HeLa-S3は浮遊培養が可能である。	RCB0007, RCB0191
HEK293 (T)	ヒト胎児腎	付着	アデノウイルス5型による形質転換細胞であり，高効率の遺伝子導入が可能である。HEK293T細胞はSV40 Large T抗原を発現する派生株である。	RCB1637, RCB2202
CHO (-S, K1)	ハムスター卵巣	付着／浮遊	増殖速度が速く倍加時間は12時間程度である。大量培養に向いている。派生株のCHO-S株は浮遊培養に適応している。CHO-K1は組換えタンパク質の生産に多用されている。	85050302*1, RCB0285
COS-1/7	アフリカミドリザル腎	付着	SV40により形質転換し，Large T抗原を発現する。	RCB0143, RCB0539

\*1 ECACC (European Collection of Cell Cultures) より提供

表2 細胞分化および組織機能の解析に用いられる細胞株

細胞株名	由来	増殖形態	特徴	理研細胞バンク
HL60	ヒト急性骨髄性白血病	浮遊	ヒト骨髓球分化の試験管内モデルである。	RCB0041
K562	ヒト慢性骨髄性白血病	浮遊	赤血球分化の試験管内モデルである。	RCB0027
Jurkat	ヒト急性リンパ芽球白血病	浮遊	ヒトT細胞のモデル系であり，免疫学研究に用いられる。	RCB0806
HepG2	ヒト肝臓がん	付着	肝臓特異的核内受容体の解析に使われている。B型肝炎ウイルスの分子生物学的研究に使われている。	RCB1886
Saos-2	ヒト骨肉腫	付着	骨基質の産生能を有しており，ヒト骨芽細胞の機能研究に用いられている。	RCB0428
F9	マウステラトカルシノーマ	付着	レチノイン酸による内胚葉分化誘導モデルである。	RCB1555
C2C12	マウス骨格筋	付着	骨格筋細胞分化の試験管内モデルである。	RCB0987
PC12	ラット副腎髄質腫	付着	NGF添加により神経細胞への分化を誘導できる。	RCB0009

## 2 細胞分化および組織機能の解析 (表2)

細胞の分化を研究の対象とする場合，興味のある分化方向に応じて細胞株を選ぶ必要がある。細胞分化の研究において未分化状態を容易に維持することが可能であり，薬剤添加などにより分化を制御することができる培養細胞株が多数確立されている。F9細胞はマウステラトカルシノーマの幹細胞をクローン化した細胞株である。レチノイン酸やジブチリルcAMPの添加により遠位内胚葉細胞あるいは近位内胚葉細胞に分化誘導することができる。2つの分化方向を選択できるので細胞分化機構の研究に用いられている。骨格筋細胞分化の分化機構や骨格筋組織の機能解析にはC2C12細胞が用いられている。マウス骨格筋より得たC2細胞の派生株であり，高コンフルエント状態，低血清下で培養すると細胞融合の始まりとともに筋管細胞が出現する。神経細胞への分化機構の解析には神経成長因子 (NGF) による分化誘導が可能なPC12が用いられている。分化機構のみならず，神経組織の機能を解析する場

表3 がん研究に用いられる細胞株

細胞株名	由来	増殖形態	特徴	理研細胞バンク
NIH/3T3	マウス胎児	付着	不死化しているががん細胞の形質をもたないことから、がん遺伝子の検出に用いられてきた。	RCB2767
U2OS	ヒト骨肉腫	付着	野生型 p53 を保持しており、アポトーシスや DNA 修復経路の解析に使われている。	HTB-96 *1
Saos-2	ヒト骨肉腫	付着	p53 を欠損しており、U2OS の対照として用いられる。	RCB0428
ヒト正常細胞	さまざまなヒト組織		さまざまな組織から分離され東洋紡績社やタカラバイオ社より提供されている。培養が難しく、分裂回数も限られている。	

\*1 ATCC (American Type Culture Collection) より提供

表4 ウイルス研究に用いられる細胞株

細胞株名	由来	増殖形態	特徴	理研細胞バンク
Vero	アフリカモドリザル腎	付着	多くのウイルスに対して感受性を示す。インターフェロンを産生しない。	RCB0001
MDCK	イヌ腎	付着	多くのウイルスに対して感受性を示す。	RCB0995
HepG2	ヒト肝臓がん	付着	肝臓特異的核内受容体の解析に使われている。B型肝炎ウイルスの分子生物学的研究に使われている。	RCB1886

合にも使われている。その他にも T 細胞由来の Jurkat 細胞や肝臓由来の HepG2 細胞のように、さまざまな組織由来のがん細胞より樹立された細胞株を用いて組織機能の解析が行われている。

### 3 がん研究 (表3)

細胞のがん化機構を解析する場合、歴史的には NIH/3T3 細胞が用いられてきた。この細胞は不死化していながらも正常細胞の形質をもつことから、がん遺伝子の同定に寄与してきた。発がんには p53 を介したアポトーシスや DNA の修復経路が大きく関与していることが知られている。U2OS 細胞は野生型の p53 を保持した細胞株であることから、当該分野で大きな役割を果たしている。

一般的に、培養細胞はがん組織より樹立されているので、発がん機構を調べるためには対照となる正常細胞が必要である。また、抗がん剤の探索 (創薬) において薬効解明や安全性試験には正常細胞が使われている。なお、培養細胞で得られた結果が正常細胞でも起きるとは限らない。したがって、正常細胞はがん化機構の解析のみならず、シグナル伝達などの他の生理現象の解析にも用いられている。

### 4 ウイルス研究 (表4)

ウイルスの増殖機構を解析する場合、標的ウイルスによる感染に対して感受性の高い細胞を選ぶ必要がある。MDCK 細胞は、コッカスパニエル雌犬の腎臓由来の細胞株であり、多く

表5 主要な細胞提供元

提供元	URL
理化学研究所	http://www.brc.riken.jp/lab/cell/
JCRB	http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank.html
ATCC	http://www.atcc.org/
ECACC	http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp
東洋紡績社	http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/index.html
タカラバイオ社	http://www.takara-bio.co.jp/

表6 ベクターの種類と特徴

発現ベクター	プロモーター	タグ	薬剤耐性遺伝子	複製起点	その他	提供元
pCAGGS	CAG			SV40		理化学研究所
pEGFP-C1	CMV	EGFP	<i>Neo<sup>r</sup></i>	SV40		クロンテック社
pCMV-HA	CMV	HA				クロンテック社
pEF-BOS	EF-1 $\alpha$			SV40		理化学研究所
pTRE-Myc	CMV <sup>*1</sup>	Myc				クロンテック社
pMSCVpuro	LTR		<i>Puro<sup>r</sup></i>		$\psi$ <sup>++2</sup>	クロンテック社
pCEP4	CMV		<i>Hyg<sup>r</sup></i>	EBNA		インビトロジェン社

\*1：テトラサイクリン応答性CMVプロモーター \*2：パッケージングシグナル

のウイルスに感受性をもつ。特にインフルエンザウイルスではA, B, C型のすべてに高い感受性をもつため、インフルエンザウイルスの増殖機構の解析に用いられている。アフリカミドリザルの腎臓より樹立されたVero細胞も、さまざまなウイルスに対して高い感受性を示し、ウイルスの分離や増幅など古くからウイルス学研究に用いられている。インターフェロンを産生しないため抗ウイルス剤の作用機序の研究に使われている。

以上のように研究対象や目的に応じて、実験に適した細胞種が異なる。上記に述べた細胞種はごく一部であり、1,000種類を超える培養細胞が株化されている。研究の背景をよく理解し、当該分野で実績のある細胞株を選ぶことが重要である。これらの細胞は理化学研究所やJCRB（医薬基盤研究所）の細胞バンクから取り寄せることが可能である。また、海外の細胞バンクのATCC（American Type Culture Collection）やECACC（European Collection of Cell Culture）から細胞を購入することもできる。正常細胞は東洋紡績社やタカラバイオ社から提供されている。表5に主要な細胞提供元のURLを記載した。

## 2 ベクターの種類と特徴

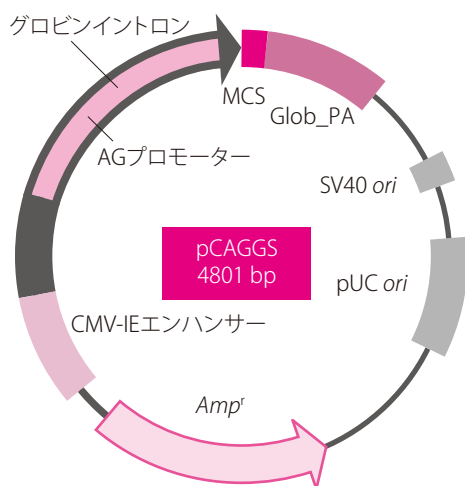
哺乳動物細胞で機能するさまざまな遺伝子発現用ベクターが流通している。そのなかから代表的かつ特徴的なベクターを選んで紹介する。ここで紹介したベクターは表6にまとめた。例に挙げたベクターは一部であり、他にも多数のベクターが存在する。目的に応じて必要な

ベクターを選ぶことが重要である。

例えば効率のよい目的タンパク質の産生のため、対象細胞種で効率よく機能するプロモーターを選ぶことが重要である。一般的に強いとされているプロモーターであっても、導入された細胞によって機能が大きく異なる。細胞依存性を排除するために広範な細胞種で発現されているアクチンやEF-1 $\alpha$  遺伝子のプロモーターを搭載したベクターが構築されているものの、対象細胞種に適したプロモーターの検討を行うとよい。対象細胞種での発現量が少ないなどの問題が生じた場合は、組織特異的プロモーターを選択する場合もある。組織・細胞種特異的プロモーターに関しては2章-5を参照してほしい。

一般に流通しているベクターは哺乳動物細胞内で効率よく発現するように設計されている。基本的には、目的のタンパク質を発現させるため、目的遺伝子のcDNAをMCSに挿入するだけとなる。高効率な発現を目指して、実験者が操作できる点はKozak配列の最適化である。目的遺伝子のcDNAをクローニングする際、翻訳開始コドン付近の配列に注意してほしい。

## pCAGGS ベクター



MCS (multi cloning site)

```
5'-TTGGCAAAGAATTCTCTCGAGGAATTCCTCTCTCAG-  
EcoR I Xho I EcoR I
```

```
GTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGG-
```

```
CCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTT-3'  
Bgl II
```

pCAGGSは広範な細胞種において目的タンパク質を高度に発現することを目的に作製された。ニトリ由来の $\beta$ -アクチン遺伝子のプロモーターおよびサイトメガロウイルス由来のCMV-IEエンハンサー (CAGプロモーター) によって目的遺伝子を転写する。CMVプロモーターを基盤とした発現ベクターに比べて、CAGプロモーターは細胞種に依存しない強力なプロモーターであり、目的タンパク質の高発現が期待できる。プロモーターの直下には $\beta$ -アクチン遺伝子のスプライシングドナーを配置し、ウサギ由来 $\beta$ -グロビン遺伝子のスプライシングアクセプターおよびポリAシグナルを搭載する。SV40由来の複製起点を搭載していることから、SV40のLarge T抗原を発現するCOS細胞や293T細胞において増幅し、目的タンパク質を大量に調製することが可能である。大腸菌内での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子およびpUC由来の複製起点を搭載している。理化学研究所バイオリソースセンターより入手できる (<http://www.brc.riken.go.jp/lab/dna/index.html>)。

### ●主な機能的DNA領域

- ・AGプロモーター：アクチンプロモーターとグロビンイントロンの融合プロモーター
- ・CMV-IEエンハンサー
- ・イントロン
- ・Glob\_PA： $\beta$ -グロビン遺伝子ポリA付加シグナル
- ・*Amp<sup>r</sup>*：アンピシリン耐性遺伝子
- ・SV40 *ori*（哺乳動物細胞での複製起点）
- ・pUC *ori*（大腸菌での複製起点）

### ●補足情報

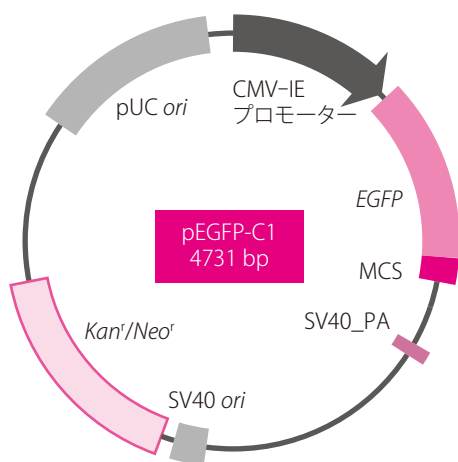
MCSに含まれる制限酵素サイトは非常に限られている。Bgl II サイトの切断面はBamHI と同じなので使い勝手がよい。

#### 参考文献

Niwa, H. et al. : Gene, 108 : 193-199, 1991

→pCAGGSベクターを最初に作製した論文

## pEGFP-C1 ベクター



pEGFP-C1はクロンテック社から販売されており、最大の特徴はEGFPを搭載している点である。CMV初期遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーにより目的遺伝子を発現する。EGFPの翻訳開始点はKozak配列であり効率的な翻訳が期待される。EGFPの下流にMCSが配置されている。目的遺伝子はEGFPのコドンとフレームをあわせて挿入しなければならない。EGFPを融合したタンパク質は細胞内における局在パターンを容易に観察することができる。またネオマイシン耐性遺伝子をSV40由来のプロモーターによって発現することができるので、G418を用いた選択により恒常発現細胞株の構築が可能である。ネオマイシン耐性遺伝子はカナマイシンも不活性化するので大腸菌の薬剤選択にはカナマイシンを用いる。またpUC由来の複製起点を搭載している。

### MCS (multi cloning site)

5'-TAC AAG TCC GGA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT-  
EGFP BspE I Bgl II Xho I Sac I HindIII

TCC AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GG-  
EcoR I Pst I Sal I Kpn I SacII ApaI SmaI

A TCC ACC GGA TCT AGA TAA CTG ATC A-3'  
BamH I

### ●主な機能的DNA領域

- ・CMV-IE プロモーター
- ・EGFP 遺伝子