

# Construction of a novel plasmid vector expressing GPI anchored Fc fragments that can select transgenic cells by magnetic sorting

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 溝越, 祐志, 鈴木, 高史, 伊吹, 謙太郎, MIZOKOSHI, Yuji, SUZUKI, Takashi, IBUKI, Kentaro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.20608/00001107">https://doi.org/10.20608/00001107</a>

## 報告

# 磁性ビーズによる遺伝子導入細胞のセレクションを可能とするGPIアンカー型Fcフラグメント発現プラスミドの構築

溝越 祐志<sup>1)</sup> 鈴木 高史<sup>1)</sup> 伊吹 謙太郎<sup>2)</sup>

## Construction of a novel plasmid vector expressing GPI anchored Fc fragments that can select transgenic cells by magnetic sorting

Yuji MIZOKOSHI<sup>1)</sup>, Takashi SUZUKI<sup>1)</sup>, and Kentaro IBUKI<sup>2)</sup>

### 要旨

遺伝子導入実験において、プラスミド導入細胞の選択・分離には、薬剤耐性遺伝子または蛍光タンパク遺伝子をプラスミドに組み込む方法が一般的に利用されている。しかし、これらの方法はネガティブセレクションが不可能なことや、セルソーター等の高価な機器が必要であるといった問題点がある。これらの問題を改善するため、本研究では新たに磁性ビーズにより遺伝子導入細胞を分離するプラスミドを開発した。このプラスミドはFcフラグメントを細胞膜上に発現する選択マーカー遺伝子を所有し、プロテインG感作ビーズを用いて、遺伝子導入細胞を選択することができる。本プラスミドを用いることで、純度95%以上の遺伝子導入細胞が得られた。本システムは簡便性および高価な機器を必要としないことから、遺伝子導入細胞セレクションの新たな方法として有効な選択肢となりうると思われる。

キーワード：選択マーカー、Fcフラグメント、磁性ビーズ、細胞分離

### Abstract

For the production of transgenic cells, antibiotic resistance or fluorescent protein genes are commonly used as selectable markers. However, the antibiotic resistance gene system is not possible for negative selection and the fluorescent protein system requires special equipment, such as a cell sorter. To overcome such problems, we constructed a new plasmid system for gene expression in mammalian cells that can isolate transgenic cells using protein G conjugated magnetic beads. This plasmid has a selectable marker gene for expressing Fc fragments on

---

1) 保健科学部医療検査学科 2) 京都大学医学部人間健康科学科

the cytoplasmic membrane, which can bind protein G and purify cells expressed Fc fragments through a magnetic technique. This could efficiently enrich transgenic cells at > 95%, as indicated when the purity was assessed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). In summary, as this system is very simple and there is no need for expensive equipment, it would be a useful tool for mammalian transformation.

Key words: selectable marker, Fc fragment, magnetic beads, cell separation

## はじめに

遺伝子組換えは産業や医療へのバイオテクノロジーの利用において中心的な役割を担う技術であり、分子生物学的な基礎実験にも必要不可欠な手法として一般的に用いられている。遺伝子組換えでは目的遺伝子を細胞に導入するためにベクターが使用されるが、ベクター導入細胞を選別するために、選択マーカー遺伝子をベクターに組み込む必要がある。哺乳類細胞への遺伝子導入に利用される選択マーカーには、薬剤耐性遺伝子、代謝欠損補完遺伝子および、レポーター遺伝子などがある。薬剤耐性遺伝子および、代謝欠損を補う遺伝子を用いる方法は、いずれもベクター未導入細胞を死滅させる工程が必要であり、選択マーカーを保持しない細胞を選抜するネガティブセレクションが不可能である。一方で、発光などのレポーター遺伝子を用いる方法は、細胞を死滅させる工程が必要なく、ネガティブセレクションも可能であるが、細胞を分取するのにセルソーターが必要となる。

本研究では、ネガティブセレクションが可能で、かつ特殊な機器を必要としない選択マーカーの作製を試み、ベクター導入細胞を磁性ビーズにより分離する系を構築したので報告する。

## 材料および方法

### 細胞培養

本研究にはヒト胚性腎臓細胞株 293T (HEK

293T; 理研 BRC-Cell Bank RBRC-RCB2202)、ヒト多発性骨髄腫細胞株 IM-9 (JCRB 細胞バンク IFO50025) および、ヒト単球系細胞株 THP-1 (JCRB 細胞バンク JCRB0112) を使用した。HEK 293T は 10% ウシ胎児血清 (FBS BioWest) を含む DMEM (ナカライテスク) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。IM-9 および THP-1 は 10% FBS を含む RPMI1640 (ナカライテスク) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

### プラスミドの構築

プラスミドの構築には pcDNA 3.1/myc-His (-) B Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific 以下 pcDNA3.1 と略) および、Michael McVoy からの寄贈品である pIRES-EGFP-puro (Addgene plasmid # 45567) を使用した。プラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチドは表 1 に示した。IM-9 と THP-1 から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて cDNA を合成した。IM-9 cDNA から IgG の Fc フラグメントを、THP-1 cDNA から CD14 遺伝子の膜移行シグナルおよび、GPI 付加シグナルをクローニングした。クローニングには Zero Blunt™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、プロトコルに従い実験を行った。

pcDNA 3.1 の Puro R 遺伝子部位にクローニングした遺伝子を挿入し、プラスミド pcDNA 3.1 - Fc を構築した。挿入には In Fusion HD cloning

kit (Takara Bio) を用い、プロトコルに従い実験を行った。また、ネガティブコントロールとして pcDNA3.1 のマルチクローニングサイト (MCS) に eGFP を挿入したプラスミドである pcDNA3.1 - eGFP を作製した。なお、本実験は神戸常盤大学遺伝子組換え実験安全委員会に承認されており、同委員会規程に則って実験を行った。

### トランスフェクション

作製ベクターを HEK 293 T 細胞へ遺伝子導入し、48 時間培養後細胞を回収した。遺伝子導入には Lipofectoamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、プロトコルに従い実験を行った。

### フローサイトメトリー (FACS) による Fc フラグメント発現の測定

細胞を遠心後、100  $\mu$ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え細胞懸濁液を作製した。10  $\mu$ L APC anti-human IgG Fc (clone M1310G05) (Biolegend) を添加後、4 $^{\circ}$ C 30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄し、FACS Calibur (BD Bioscience) により測定した。解析には Cell Quest pro (BD Bioscience) を用いた。

### 磁性ビーズによる細胞分離および解析

Dynabeads Protein G (ThermoFisher 以下 磁性ビーズ) 20  $\mu$ L を 2 mL tube に分注後、マグネットに磁性ビーズを結合させ上清を除去した。培養液 500  $\mu$ L に懸濁した遺伝子導入 HEK 293 T 細胞を磁性ビーズに加え、穏やかに混和しながら室温で 30 分間反応させた。マグネットに磁性ビーズを結合させ、磁性ビーズに結合しなかった細胞群が含まれる上清をネガティブフラクションとして回収した。磁性ビーズを PBS 500  $\mu$ L で 3 回洗浄後、PBS 500  $\mu$ L に懸濁し、磁性ビーズに結合した細胞群をポジティブフラクションとして回収した。ネガティブフラクション、ポジティブフラクションを FACS および共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM710 (Carl-Zeiss) により測定し、共焦点顕微鏡の結果は ZEN 2010 を用いて解析を行った。ポジティブフラクションの細胞に関しては、Dynabeads Protein G が結合した状態で解析を行った。

## 結果

### プラスミドの特徴

作製した pcDNA3.1 - Fc のプラスミドマップを図 1 に示す。pcDNA3.1 - Fc は目的遺伝子挿入部位である MCS の他に、磁性ビーズにより分離するための Fc フラグメント発現ユニットをもつプラスミ

表 1 プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチド

Name	Size (nt)	sequence (5' → 3')	Function
CD14 F	31	GAATTTCCTTATCGACCATGGAGCGCGCTCC	CD14 cloning
CD14 R	24	TCTAGATTAGGCAAAGCCCCGGGC	
Fc F	30	GTCTCTGCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG	Fc cloning
Fc R	22	TTTACCCGGAGACAGGGAGAGG	
GPI F	22	GTCAACTCCGGCGTGGTCCCAG	GPI attachment signal cloning
GPI R	19	GGGCCCTTGAGCAGCAC	
pcDNA3.1 $\Delta$ puroR Sense	18	ATCGATACCGGTGTTAAC	Puro R deletion
pcDNA3.1 $\Delta$ puroR Anti	20	CGGTAAACACCGGTATCGAT	
in Fu IRES eGFP F	30	CTTTGCCTAATCTAGTTGCATCGATCCGCC	IERS eGFP insertion
in IRES eGFP R	41	CTTGGTCGGTCATTTTCGGTTTCAGTTATCTAGATCCGGTGG	
in Fc F	38	CTCCCATCGATACCGGTGTTATGGAGCGCGCTCCTGC	Fc insertion
in Fc R	28	TGCAACTAGATTAGGCAAAGCCCCGGGC	

ドである。Fcフラグメント発現ユニットはSV40 promoter、膜移行シグナル、Fcフラグメント発現遺伝子および、GPI付加シグナルから構成される。Fcフラグメントが細胞内で発現すると膜移行シグナルにより細胞膜へ移行し、GPI付加シグナルを介してGPIアンカーにより細胞膜上に繋ぎとめられる。Fcフラグメントと結合する性質をもつタンパク質であるProtein Gを感作させたビーズを用いることで、遺伝子発現細胞を磁石により分離することが可能となる(図2)。また、pcDNA3.1 - Fcにはinternal ribosomal entry site (IRES) とeGFP遺伝子から構成されるeGFP発現ユニットが組み込まれており、プラスミド導入細胞はFcフラグメントとeGFPをバイシストロニックに発現する。これにより、磁性ビーズによる分離能を評価することができる(図1)。

### Fcフラグメント発現の評価

プラスミドのFcフラグメント発現ユニットが機能しているかを評価するため、FACSにより細胞膜上のFcフラグメント発現を測定した。トランスフェクションを行ったHEK 293T細胞は、細胞膜上にFcフラグメントが発現している細胞群と発現していない細胞群の2つに分かれた(図3A)。また、FcフラグメントとeGFPを共発現している細胞が30.8%であり、eGFPを発現している細胞の86.5%(30.8% / 35.6%)がFcフラグメントを細胞膜に発現していた(図3B)。

### 磁性ビーズによる分離能の評価

pcDNA3.1 - Fc導入細胞が磁性ビーズにより分離可能かを評価するため、ネガティブコントロールとしてpcDNA3.1 - eGFPをトランスフェクションした細胞群と、pcDNA3.1 - Fcを導入した細胞群のポジティブフラクションに、細胞が存在するかを

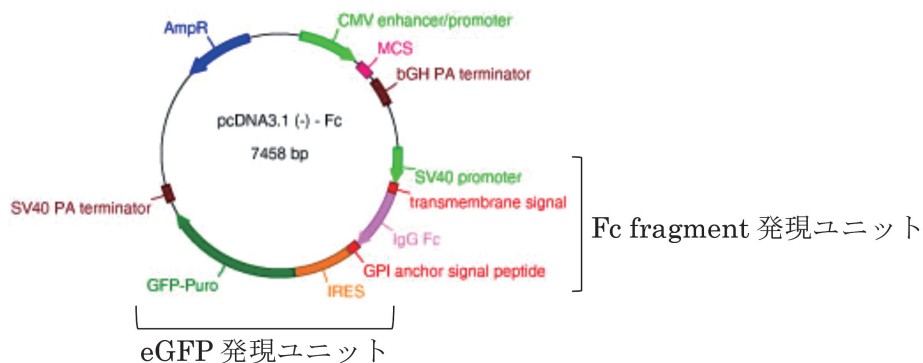


図1 pcDNA3.1 - Fc プラスミドマップ

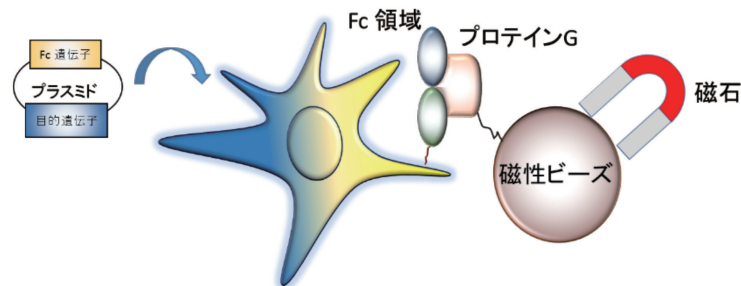


図2 磁性ビーズによる細胞セレクションの概要  
 プラスミドが導入された細胞は膜上にFcフラグメントを発現する。プロテインG感作磁性ビーズを用いることで、細胞膜上のFcフラグメントとプロテインGが結合し、磁石によりプロテインG感作ビーズに結合した遺伝子導入細胞を回収することができる。



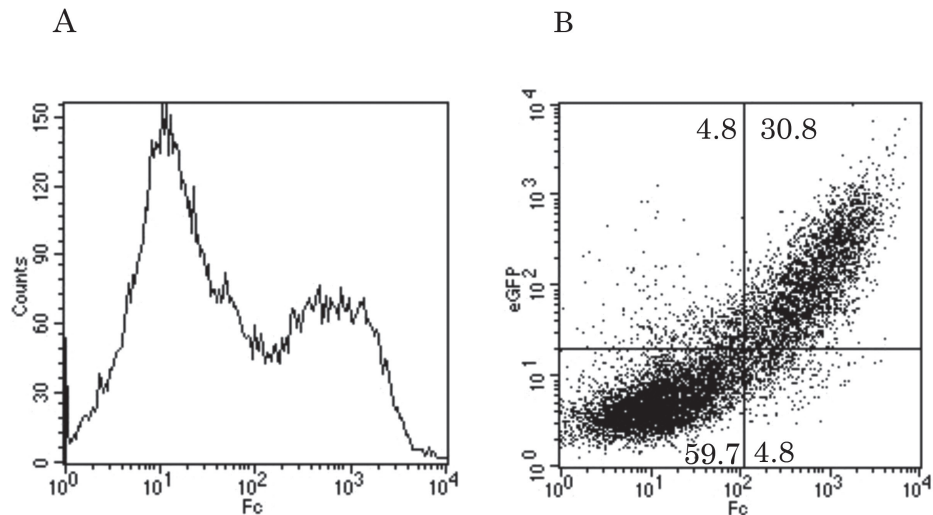


図3 FcフラグメントおよびeGFPの発現解析  
 (A) トランスフェクション後293T細胞の細胞膜上のFcフラグメント発現結果の一例を示している。Fcフラグメントが発現している細胞群と発現していない細胞群が観察された。  
 (B) トランスフェクション後293T細胞のFcフラグメントおよびeGFPの発現結果の一例を示している。数値は各象限に含まれる細胞の割合を示している。Fcフラグメントを発現している細胞の86.5%がeGFPを発現していた。

FACSにより比較検討した。pcDNA3.1 - eGFPを導入した細胞群ではポジティブフラクションに細胞が検出できなかったが、pcDNA3.1 - Fcを導入した細胞群ではポジティブフラクションに細胞が検出された(図4A)。さらに、pcDNA3.1 - Fc導入細胞の分離能を評価するため、分離前と分離後の細胞群に含まれるeGFP陽性細胞の割合を検討した。分離前は27.1%の細胞がeGFP陽性であった。分離後の細胞群では、ネガティブフラクションに含まれるeGFP陽性細胞の割合は11.2%であり、分離前と比較してeGFP陽性細胞の割合が減少していた。一方で、ポジティブフラクションに含まれるeGFP陽性細胞の割合は96.8%と、分離前より増加していた(図4B)。また、FACSの結果と同様に、共焦点顕微鏡の結果からも、分離後のポジティブフラクションではeGFP陰性細胞と比べてeGFP陽性細胞の比率が大きいことが確認された(図4C)。

### 考察

Chesnutらは、一過性遺伝子導入細胞のセレクト

ションマーカーとして、ハプテンである4-エトキシメチレン-2-フェニルオキサゾール-5-オン(phOx)に対する一本鎖抗体と、血小板由来成長因子受容体膜貫通ドメインの融合タンパクを細胞膜上に発現させ、細胞を分離する実験系を報告している<sup>1)</sup>。しかし、磁性ビーズに抗原となるphOxを感作する必要があり、膜貫通ドメインにより細胞膜上に抗体を発現させているため、セレクトションマーカーを膜上から切り離すことができないという欠点があった。我々が今回構築したプラスミドは、抗体の一部であるFcフラグメント発現遺伝子を用いており、Fcフラグメントと特異的に結合するprotein G beadsを用いて遺伝子導入細胞の分離を行っている。protein G beadsは他の実験系でも広く利用されており、入手が簡易で準備しやすいということが利点として挙げられる。また、Poitevinらは抗体産生遺伝子を導入したCHO細胞を効率的に分離する方法として、Anti-IgG MicroBeadsを用いた方法を報告しているが、抗体産生細胞を純度よく分離するためには、分離の作業を複数回繰り返す必要があることを示している<sup>2)</sup>。通常、遺伝子導入した抗体

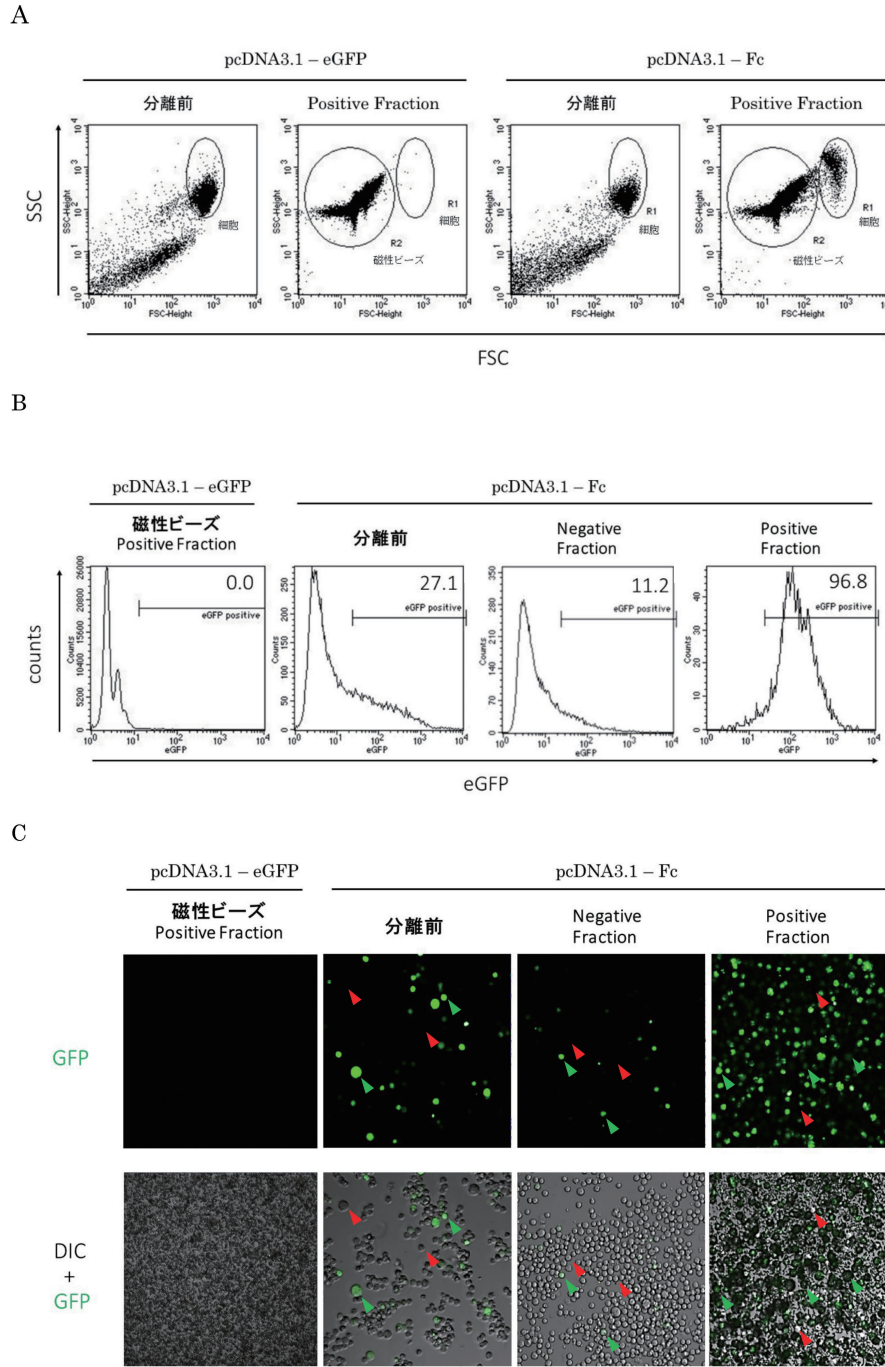


図4 構築プラスミドを用いたセレクションの評価

- (A) pcDNA3.1 - eGFP (ネガティブコントロール) または、pcDNA3.1 - Fc をトランスフェクションした細胞群の Positive Fraction の FSC と SSC を FACS で観察した 1 例を示している。R1 分画が分離された細胞を、R2 分画が磁性ビーズを示している。pcDNA3.1 - eGFP 導入細胞群では Positive Fraction に細胞が含まれておらず、pcDNA3.1 - Fc 導入細胞群では Positive Fraction に細胞が存在していた。
- (B) トランスフェクション後 293T 細胞の、pcDNA3.1 - eGFP 導入細胞群の磁性ビーズ分画 + Positive Fraction、pcDNA3.1 - Fc 導入細胞群の分離前、Negative Fraction、Positive Fraction に含まれる eGFP 陽性細胞の割合を、FACS で解析した結果の 1 例を示している。数値は各分画に含まれる eGFP 陽性細胞の割合を示している。pcDNA3.1 - Fc 導入細胞群では、分離前と比較してポジティブフラクションに含まれる eGFP 細胞の割合が顕著に増加していた。
- (C) トランスフェクション後 293T 細胞の、pcDNA3.1 - eGFP 導入細胞群の Positive Fraction、pcDNA3.1 - Fc 導入細胞群の分離前、Negative Fraction、Positive Fraction に含まれる eGFP 陽性細胞の割合を、共焦点顕微鏡で観察した結果の 1 例を示している。上段は eGFP、下段は eGFP+ 微干渉の顕微鏡像を示している。eGFP 陰性細胞および eGFP 陽性細胞の例を、それぞれ赤矢印と緑矢印で示している。pcDNA3.1 - Fc 導入細胞群のポジティブフラクションでは、赤矢印で示す eGFP 陰性細胞と比較して緑矢印で示すような eGFP 陽性細胞が多く観察された。

や Fc フラグメントは細胞外に分泌されるため、これらを細胞に発現させただけでは、抗体や Fc フラグメントを介した細胞の分離効率は悪くなる。そこで本研究では、分離効率を改善するため Fc フラグメント遺伝子の下流に GPI アンカー付加シグナルを挿入し、Fc フラグメントを細胞膜上に留めることを試みた。Fc 遺伝子がセレクションマーカーとして機能するうえで Fc フラグメントが細胞膜上に留まることが重要な要素となるが、本研究では、eGFP を発現している細胞の 86.5% (30.8% / 35.6%) が Fc フラグメントを細胞膜に発現していたことから、プラスミドが導入された細胞では、Fc フラグメントが GPI アンカーを介して細胞表面上に留まっていることが推測された (図 3)。また、実際に磁性ビーズを用いた分離実験において、ポジティブフラクションに含まれる eGFP 陽性細胞の純度が分離前より増加していたことから、遺伝子導入細胞に発現した Fc フラグメントに、プロテイン G 磁性ビーズが結合し、遺伝子導入した細胞を選択的に分離できていると考えられた (図 4B)。

遺伝子導入細胞の分離能を評価すると、本システムを用いた検討では純度約 97% の遺伝子導入細胞を得ることができた。本システムと同様にネガティブセレクションも可能な、発光遺伝子を用いたセレクション方法では目的細胞を純度 97% 以上に純化できることが報告されており<sup>3)4)</sup>、本システムは既存の方法と同等の純度を得る結果となった。純度という点では、Fc フラグメント発現遺伝子がセレクションマーカーとして利用できることが明らかとなった。ただし、本研究では分離に用いた磁性ビーズを細胞から取り外していないという課題がある。GPI アンカーはホスホイノシドホスホリパーゼ C (PI-PLC) 処理により、細胞膜から切断できるため、今後 Fc フラグメントを細胞膜から切り離し磁性ビーズを除去することが可能か検討を行う必要がある。また、磁性ビーズに関しても、サイズが極めて小さく、細胞から外す作業が必要ないビーズが開発されている。そのビーズの細胞内挙動をモ

ニターした実験では、時間経過とともに細胞内でビーズが分解されることも報告されており<sup>5)6)</sup>、実験に用いる磁性ビーズの選定についても今後検討が必要である。さらに、今回の実験ではレポーターとして用いた eGFP 遺伝子を MCS に挿入して評価を行っていないことが課題としてあげられるため、MCS に目的遺伝子を挿入したときの分離効率の検討も行っていきたいと考えている。

磁性ビーズを用いた手法は広く利用されており、簡便かつ迅速に分離を行うことが可能である。また、特殊な設備も必要としないことも利点として挙げられる<sup>7)</sup>。本研究では Fc フラグメントを利用した系で、遺伝子導入細胞を分離できることが明らかとなった。今後改良の必要性はあるが、本システムは遺伝子導入細胞のセレクションまでの日数を短縮できることや、高価な機械を必要としないという利点があり、実験目的に合わせて既存のシステムと使い分けることで、実験の効率化を図ることができると考えられる。

## 謝辞

本研究は、平成 30 年度神戸常盤大学テーマ別研究「新規遺伝子導入細胞セレクションシステムの開発」として研究助成を受けました。

本研究の進行を支えてくれた則本幸紀、湯浅颯太の諸氏に深謝いたします。

## 文献

- 1) Chesnut JD et al. Selective isolation of transiently transfected cells from a mammalian cell population with vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody. *J Immunol Methods*. 1996 vol. 193, p. 17-27.
- 2) Poitevin Y et al. Magnetic sorting of membrane associated



- IgG for phenotype-based selection of stable antibody producing cells. *J Immunol Methods*. 2017, vol. 444, p. 1-6.
- 3) Basu S. et al. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp*. 2010 Jul 10; vol. 41, doi: 10.3791/1546.  
<https://www.jove.com/video/1546/purification-specific-cell-population-fluorescence-activated-cell>, (参照 2019-09-29) .
- 4) Nitta N. et al. Intelligent Image-Activated Cell Sorting. *Cell*. 2018, vol. 175, p. 266-276.
- 5) Müller P. et al. Data on the fate of MACS<sup>®</sup> MicroBeads intramyocardially co-injected with stem cell products. *Data Brief*. 2017, vol. 13, p. 569-574.
- 6) Müller P. et al. Intramyocardial fate and effect of iron nanoparticles co-injected with MACS<sup>®</sup> purified stem cell products. *Biomaterials*. 2017, vol. 135, p. 74-84.
- 7) Ivo Safarik; Mirka Safarikova. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol*. 2004, vol. 2, no. 7, doi: :10.1186/1477-044X-2-7.  
<http://www.biomagres.com/content/2/1/7>, (参照 2019-09-29) .