

## ◆レトロウイルスベクター（P2 レベル）を使って樹立した外来タンパク質発現培養細胞のレベルダウンについて

外来タンパク質の発現に利用される（**自立増殖欠損型**）**レトロウイルスベクター**は組換えレトロウイルスであるため、その使用（作成）の**封じ込めレベルはP2以上**になります。したがって、レトロウイルスベクターを使って樹立した外来タンパク質発現培養細胞もレトロウイルス粒子の残存が否定できず、同レベルの封じ込めが適応されます。しかしながら、組換えレトロウイルスが自立増殖しない場合、外来遺伝子導入細胞を培養していくと残存ウイルス粒子も最終的には失活し存在しなくなると予想されます。感染性ウイルス粒子が存在しなくなったことが明らかになれば、樹立した外来タンパク質発現細胞を遺伝子組換え実験の規制対象外とすることができます。

このようなレベルダウンに対しての実験的根拠を得るため、今回、以下のような実験を行いました。今後、**以下の実験と本質的に同じ方法で作成されていると判断される外来タンパク質発現細胞についてはレベルダウンを認める可能性があります**のでお知らせします。

1. レトロウイルスベクターを使って樹立した外来タンパク質発現細胞に残存感染性レトロウイルス粒子が存在するかどうかを調べた実験（微生物感染症学部門・井上寛一准教授による）

### 【実験材料】

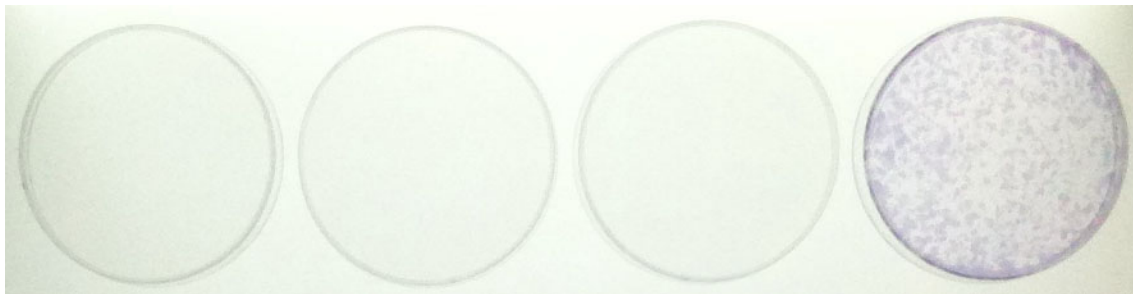
1. pCXbsr retrovirus : gag, pol, env を欠損した Moloney murine leukaemia virus のゲノムに blasticidin 耐性遺伝子を組込んだレトロウイルスベクター（組換えレトロウイルス）（pCXbsr プラスミドを使って作成）（文献：PNAS 97, 7290-7295, 2000）
2. 3Y1 細胞 (rat fibroblast cell line)

### 【実験方法】

1. blasticidin 耐性コロニーの形成
  - 1)  $2 \times 10^5$  の 3Y1 細胞を dishes (直径 60 mm) に播く。
  - 2) 翌日、pCXbsr retrovirus を  $4 \times 10^3$  CFU (colony forming unit)/dish (0.3 ml/dish) で感染させる。
  - 3) その後、選択培地 (blasticidin  $5 \mu\text{g/ml}$ ) を加え培養。
  - 4) 感染 6 日後 blasticidin 耐性コロニーが形成される。
  - 5) ①培養上清 (5 ml) を  $-80^\circ\text{C}$  で保存  
②コロニーを作る細胞を 1 ml PBS に浮遊し凍結融解後 (5 回)  $-80^\circ\text{C}$  で保存

2. ①培養上清と②コロニーに含まれる残存感染性 pCXbsr retrovirus の定量
- 1)  $2 \times 10^5$  の 3Y1 細胞を dishes (直径 60 mm) に播く。
  - 2) 翌日、以下の条件で感染
    - a) ①培養上清を 0.5 ml/dish (計 3 dishes)
    - b) ②凍結融解細胞分画を 0.5 ml/dish (計 2 dishes)
    - c) ウイルスを含まない培養液を 0.5 ml/dish (mock-infected)
    - d) pCXbsr retrovirus を 0.5 ml/dish ( $4 \times 10^3$  CFU/dish)
  - 3) 選択培地 (blasticidin  $5 \mu\text{g/ml}$ ) 5 ml を加え 10 日間培養
  - 4) ギムザ染色 (図 1) により blasticidine 耐性コロニーをカウント (表 1)

【結果】



①培養上清                      ②細胞分画                      Mock-infected                      pCXbsr retrovirus

図 1

pCXbsr retrovirus 感染後 (blasticidin で選択) 6 日での①培養上清と②細胞分画の blasticidin 耐性コロニー形成能。negative control: Mock-infected、positive control: pCXbsr retrovirus

表 1 pCXbsr retrovirus 感染後 (blasticidin で選択) 6 日での残存感染性 pCXbsr retrovirus

	①培養上清	②細胞分画	Mock-infected	pCXbsr retrovirus
Blasticidin 耐性 コロニー (colonies/dish)	0 (dish 3 つとも)	0 (dish 2 つとも)	0	~1980
感染性 pCXbsr retrovirus (CFU/ml)	0	0	0	~ $4 \times 10^3$

pCXbsr retrovirus 感染から約1週間後 (blasticidin 耐性コロニーが形成される頃) には、感染性のある pCXbsr retrovirus は培養上清にも細胞分画にも検出されなかった (検出感度以下であった) (図1と表1を参照)。

以 上