

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380203

研究課題名(和文) IR/MAR 遺伝子増幅法を核とした、革新的細胞工学技術の発展

研究課題名(英文) Advancement of revolutionary cell technology based on the IR/MAR gene amplification method

研究代表者

清水 典明 (Shimizu, Noriaki)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10216096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000 円

研究成果の概要(和文)：代表者は、哺乳動物複製開始領域(IR)と、核マトリックス結合領域(MAR)を持つプラスミドが、動物細胞内で自発的に増幅し、染色体外因子であるDMや染色体内のHSRを形成することを見いだした。本研究では、この方法を革新的な細胞工学技術へと発展させることを行った。その結果、1) 遺伝子増幅に必要な最短の配列を同定し、複製開始との関連を明確にした。2) 遺伝子増幅の機構を明確にした。3) 増幅した配列からの遺伝子発現を高めるヒトゲノム配列を単離し、性状を明確にした。4) 染色体の断片化により、がん遺伝子が増幅したDMが新たに形成されることを示した。5) DMの細胞内維持や、細胞外排出の機構について理解を得た。

研究成果の概要(英文)：We previously found that a plasmid bearing mammalian replication initiation region (IR) and a nuclear matrix attachment region (MAR) was amplified spontaneously in animal cells and generate extrachromosomal DMs or chromosomal HSR. This study aimed to develop this method to a novel cell technology. Consequently, 1) we identified minimal required sequence for gene amplification, and clarified the relationship to DNA replication. 2) We clarified the mechanism of gene amplification. 3) We isolated a human genome sequence that enhance the gene expression from tandemly repeated sequence. 4) We showed that the pulverization of chromosome de novo generates DMs that had amplified oncogenes. 5) We obtained the understanding about the intracellular maintenance and extracellular elimination of DMs.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：遺伝子増幅 細胞工学技術 組換え蛋白質生産 染色体外遺伝因子 Double minutes 細胞癌化

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子や薬剤耐性遺伝子の増幅は、その遺伝子産物が増加することにより、広範なヒトがん細胞の悪性化に重大な寄与をしている。増幅した遺伝子は、染色体外遺伝因子である Double Minutes (DM)か、染色体上の均一染色領域 (Homogeneously Staining Region ; HSR) に局在する。DM は、セントロメアもテロメアも持たず、ゲノム由来の数メガ塩基程度の自律複製する環状DNA からなり、がん細胞あたり数個から多くて数百個存在する。研究代表者は、DM が細胞から排出されるとがん細胞が正常化/分化することを以前に見いだした。そのようなDM の排出は、細胞質に生じる微小核に選択的に取り込まれることを介しており、その原因を追求した一連の研究から、自律複製する染色体外遺伝因子の細胞周期進行にともなう細胞内動態と細胞外排出について、独自に新領域を切り開いてきた。さらに、そのような研究を行う過程で研究代表者は、哺乳動物複製開始領域 (initiation region; IR) と核マトリックス結合領域 (Matrix Attachment Region; MAR) を持つプラスミドが、動物細胞内で、細胞あたり数千コピー程度にまで、きわめて効率よく短期間で増幅され、がん細胞にみられるDM やHSRと見かけ上区別のつかない構造を形成することを見いだした。「IR/MAR 遺伝子増幅法」と名付けたこの技術は、自律複製する染色体外遺伝因子が媒介する遺伝子増幅を実験的に効率よく再現する。研究代表者はその後、この技術を土台に、以下の研究を行ってきた。1) 遺伝子増幅の分子機構に関する理解を深めた。2) DM やHSRの細胞内動態、遺伝子発現、排出、に関する理解を深めた3) 染色体、核の機能構造に関する、基礎生物学研究を行った。4) 抗体医薬等、有用な蛋白質生産に応用するための検討を行った。

2. 研究の目的

(本研究全体の目的) IR/MAR 遺伝子増幅法を活用する上で最も重要で未解決な4つの密接に関連した課題A~Dを厳選し、それらについて明確に解決する。そのことにより、基礎/応用両面で、多大な波及効果を持つ体系的な細胞工学技術へと進化させる。

(課題A) IR 配列をもとに、遺伝子増幅を促進する最小・最強な配列を得て、活用する。

IR/MAR プラスミドを用いた遺伝子増幅には、IR (複製開始領域) からの複製開始が必要であることが、研究代表者の研究室での様々な結果から示唆されている。そこで本研究では、遺伝子増幅に必要な最小限な配列がどのような配列であるのかを、Aladjem 博士 (米国NIH) との密接な協力関係を生かして、レプリケーター配列との関連のもとに明確にする。

(課題B) 染色体外因子の形成と維持を支配する機構を理解し、活用する。

IR/MAR 遺伝子増幅法は、発がんにとまなう遺伝子増幅同様、宿主細胞によって遺伝子増幅

の程度や、増幅形態 (DM / HSR / 他)、が大きく異なる。この際、導入したIR/MARプラスミドが染色体外で維持される過程が鍵になる。染色体外遺伝因子が細胞から排出されずに安定に保持されるには、特別な遺伝的背景が必要である。そこで本研究では、宿主細胞のどのような遺伝的背景が、DM の安定保持に關与するかを明確にする。その中で、染色体外因子がどのように形成されるかを明確にする。

(課題C) 増幅した遺伝子からの発現を高めるゲノム配列を単離し、活用する。

遺伝子増幅した領域は反復配列となるため、エピジェネティックな遺伝子サイレンシングを受けやすい。そのようなサイレンシングを受けないようにするには、インシュレーター配列、エンハンサー配列、MAR等の発現増強配列、等々のゲノム中に散在していて、多くは未解明の配列について、系統的にスクリーニングして利用する必要がある。そこで本研究では、遺伝子増幅した遺伝子からの発現を高める配列を、IR/MAR 遺伝子増幅法を基盤として独自に考案した手法により、系統的にスクリーニングを行って単離する。

(課題D) DMがどのように細胞から排出されるかを明確にし、排出されたDMを細胞間で水平伝播する実験系を樹立する。

DM は、DNA 傷害が生じる条件で凝集し、細胞質で微小核を形成し、その一部は細胞外へ放出されることを、研究代表者は以前に見いだした。そこで本研究では、どのような機構で細胞外へと排出されるかを明確にするとともに、細胞外に放出された微小核が、別の細胞と融合することを介して、中のDM が細胞間で伝播する可能性について検討する。

3. 研究の方法

(課題A) IR 配列をもとに、遺伝子増幅を促進する最小配列を得る。

《レプリケーター活性との関係》米国NIHのAladjem 博士は、染色体の異所的部位での複製開始を評価する従来法を用いて、-globin IR についてプリケーター活性を失った変異配列を得ている。本研究では、そのような配列について、IR/MAR 法を用いて遺伝子増幅誘導活性を測定する。すなわち、IR/MAR を持つpTV-MCS プラスミドのクローニング部位に標的配列を挿入し、そのHSR 形成能力を測定する。このアッセイ法は極めて感度が高く、バックグラウンドが低く、再現性の高い方法である。得られた遺伝子増幅誘導活性と、レプリケーター活性とを比較することにより、遺伝子増幅の誘導と複製開始の関係について理解する。《増幅に必要な最小配列の同定》

-globin IR について、その全長 (2,700bp) をカバーする互いに約100~200 bp ずれた12本の1,000bp 配列をPCR 増幅し、その産物をIn Fusion 反応によりpTV-MCS プラスミドへクローニングし、そのDNAについて前の実験と同様に遺伝子増幅誘導活性を定量する。そのような実験を繰り返すことにより「遺伝子増

幅を誘導する必要充分な領域」を同定する。得られた配列内に特徴的な要素配列を検索する。その結果を、以前のDHFR 遺伝子座、c-myc 遺伝子座での結果と比較し、どのような要素配列がどのように配置されているかについてのルールを帰納する。

(課題B)染色体外因子の形成と維持を支配する機構を理解し、活用する。

ヒトや齧歯類の様々な細胞株について、IR/MAR 遺伝子増幅法によりどのような増幅構造が形成されるかに関する検討を行い、一覧表を得る。DM の安定保持を支配する遺伝的背景を知るために、以下の実験を行う。すなわち、IR/MAR 遺伝子増幅法を用いて、DM 上にBS 抵抗性遺伝子を持つCOLO 320細胞をドナー細胞を得る。一方、多様な齧歯類細胞に、Neo 抵抗性遺伝子を発現させ、これをアクセプター細胞とする、ドナー細胞とアクセプター細胞を融合し、安定な融合細胞はBS/Neo 存在下で選別する。融合細胞内でDMが、長期間安定に維持されるか否かを時間経過を追って検討する。

(課題C) 増幅した遺伝子からの発現を高めるゲノム配列を単離し、活用する。

超音波処理で断片化したヒトゲノムDNAから、大腸菌を宿主としてライブラリーを作成する。この際用いるベクターは、IR/MAR 配列、BS 抵抗性遺伝子およびd2EGFP遺伝子を持つ。ライブラリーのプラスミドDNA を、CHO DG44 細胞にリポフェクション法で導入し、形質転換細胞をBSで3~4 週間かけて選択する。この間に、IR/MAR プラスミドは遺伝子増幅するが、同時に導入したDNA は常に共増幅するので、1つのコロニーを構成する細胞には十種類以上のライブラリープラスミドが共増幅している。累計10 万個以上のコロニーについて、d2EGFP 発現の高い細胞をセルソーター(FACSria)で分離し、増殖後再びセルソーターで高発現細胞を分離する。そのような細胞をコロニー形成させ、蛍光顕微鏡で生コロニーを観察することでd2EGFP をもっとも強く発現するコロニーを百個程度選別する。そのような細胞につき、FISH によりプラスミドDNA の増幅状況を検討した後、プラスミドに挿入されていたゲノム断片をPCR により増幅し、再びIR/MAR プラスミドに挿入して2 次ライブラリーを作る。それを用いて、以前と同様の操作で、d2EGFP 発現の高い細胞を得る。このようなサイクルを繰り返すことで、IR/MAR 遺伝子増幅法により形成された増幅領域からの遺伝子発現を再現性良く高めるゲノム配列が得られる。そのような配列を10 種類以上単離し、再現性良く遺伝子発現を高めるヒトゲノム配列をクローニングする。塩基配列上の特徴を、公知のヒトゲノム配列と比較しながら解析する。また、WEB 上の検索アプリケーション等を用いて、どのような高次構造や機能を持つと予想される配列であるか、について、様々な視点から検討する。

(課題D) DM を、細胞間で水平伝播する実験系を樹立し、活用する。

我々は以前、細胞外に放出された微小核を精製する方法を樹立した。最初にそのような方法を再検討して、より迅速に精製できる方法を樹立する。そのような細胞外微小核はDM を高度に濃縮している。課題Bで用いたDM 供与細胞から細胞外微小核を精製し、それをPEG を用いて受容細胞と融合させる。この場合はDM のみが受容細胞へ移され、それを持つ細胞が増殖するようになるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(課題A)遺伝子増幅を促進する配列の同定。

当初計画を記した「3. 研究の方法」のとおり進行した。beta-globin IR の変異体を用いた解析から、IR/MAR プラスミドが動物細胞内で遺伝子増幅するために必要な配列は、染色体腕の中の異所的部位での複製開始に必要とされる配列と、必ずしも一致しなかった。さらに、beta-globin IR をもとにして、遺伝子増幅を支持する必要最小限の 592 bp にまで絞り込むことができた。このような配列には、MAR, MAR-like element, AT-rich element が含まれていたことは、染色体内の異所的部位での複製開始に必要とされる配列と共通していた。興味深いことに、両アッセイ系ともに AG-rich 配列を必要としていたが、異なった部位の AG-rich 配列を必要としていた。このことは、染色体内と染色体外では、複製開始に大部分が共通するが、AG-rich のみが異なる部位のものを要求していることを意味しており、きわめて興味深い。このような成果は、*PLoS ONE* 誌に 2013 年公表した(論文成果 2)。

(課題B)染色体外因子の形成と維持に関する理解と応用。

当初計画の通り進行下が、予想外の大きな伸展がみられた。すなわち、最初に様々な細胞について IR/MAR プラスミドが染色体外で増幅するかどうかの検討を行い、一連の結果を得た。このうち齧歯類の細胞を Neo 耐性のアクセプター細胞とし、BS を持つ IR/MAR プラスミドと c-myc が DM 上で増幅している COLO 320 細胞を DM ドナー細胞として、両者を融合し、2 重薬剤選別で安定融合細胞を選別した。その結果、セントロメアを持つヒトの染色体は微小核に取り込まれて PCC (premature chromosome condensation)により断片化されて失われていったのに対し、セントロメアを持たないDMはヒト-齧歯類融合細胞内で安定であった。その結果、ヒトに由来する Alu 配列を持つ多数のDMを、マウス染色体の中に持つ細胞が得られた。このようなDMが維持される効率は、齧歯類の細胞によって異なり、それは IR/MAR プラスミドからDMが形成される効率と良く関連したことから、DMを維持する効率には細胞の遺伝的背景が重要であることが明確に示された。さらに、このようなDMは、DMドナー細胞に由来する

ものもあったが、ヒト染色体が断片化したことにより新たに形成されたDMもあった。そのようなDMで増幅している配列を、細胞のクローン化とヒトゲノムのマイクロアレイ解析により検討したところ、もとのヒト細胞で増幅しているヒトゲノム領域と全く違う領域であったことから、新規に増幅して形成されたDMであることが間違いなく示された。さらにこのような領域には、IL6やTR10のようなヒト細胞のがん化にともなって増幅することが知られている遺伝子が含まれていた。以上のことは、ヒト染色体が断片してDMができること、その際に複数の染色体領域から細胞増殖に利点を与える遺伝子がDM上で増幅すること、が示された。以上のことは、ヒト癌化の過程でDMがどのように形成されるかについて、きわめて重大な意義を持つ。このような成果の一部は既に学会発表を行った(4, 9, 14, 22)。最新の成果までまとめた論文は、現在投稿中である。

課題Bに密接に関連して、当初計画にはなかったが、低酸素環境が染色体外のDMの形成と維持に与える影響を検討した。これは、生体内のがん組織が低酸素環境にあり、そのようなヒトがん細胞にはDMが含まれる場合が多いという論文をもとにした発想である。その結果、3~5%酸素濃度で培養することにより、DMの「形成」「維持」の両面で効率が高まることが示唆された。また、染色体外では遺伝子発現が高いことを反映して、低酸素状態で培養することで、目的遺伝子がDMで増幅され、そのことにより蛋白質発現が高くなることを見いだした。以上の成果は、学会発表(下記リストの5)を行った。また、できるだけすみやかに論文発表する予定でいる。

(課題C) 増幅した遺伝子からの発現を高めるゲノム配列の単離と性状解析。

当初の計画通り進行し、大きな成果が得られた。すなわち、「3. 研究の方法」で記した実験により、ヒト2番染色体の遺伝子が乏しい領域に由来する3,265 bpの配列が得られた。この配列はB-3-31配列と称し、高度にAT-rich (67.8%)である配列であった。IR/MAR遺伝子増幅法で増幅させた配列は、直列反復の配列が連続するために、きわめてサイレンシングを受けやすい。そのため、CTCF typeのインシュレーター配列、プロモーター上流のパリンドローム配列、あるいは湾曲(bent)配列といった従来の報告にある「遺伝子発現を高める配列」は殆ど効果がなかったのに対し、このB-3-31配列は、5回以上の実験で再現性良く、IR/MAR法で増幅した反復配列からの発現を高めた。このような成果は、特許申請(知財の1)、学会発表(3, 6, 12)をおこなった。また、その内容をまとめた論文を現在投稿準備中である。

(課題D) DMを濃縮した微小核の、細胞外への排出機構と、細胞外微小核を介したDMの

細胞間伝播実験系の樹立。

DMを濃縮した微小核は、細胞質膜が大きく突出したプレップに取り込まれることは、以前の研究で見いだされていた。本研究で、このようなプレップの根本がアクチンからなる収縮環と極めて似た構造を形成し、細くくびれることを見いだした。このような構造は、細胞質分裂時であれば自然に千切れるが、間期では自然に千切れることはなかった。しかし、培地が揺れた程度のごく弱い物理的刺激で簡単に千切れた。プレップは新鮮血清で効率よく誘導されることから、がん細胞が転移する際、血中に出るとプレップが誘導され、それが血流の刺激で千切れることで、DMを濃縮した微小核が細胞外に放出されるという機構が考えられた。一方、このような細胞外微小核を精製し、課題Bで検討した受容細胞に対して融合し、低酸素条件で培養することにより、DMの細胞間転移の実験系を樹立することを試みた。その結果、DMの転移自体はどの受容細胞を用いても実証することができた。しかし、供与細胞(ヒトCOLO 320)と近縁な受容細胞であれば、DMを受け取った細胞が増殖出来たが、種類の異なる細胞間でDMを転移させた細胞は、現在のところ、増殖しなかった。このような成果は、学会発表(4, 9, 14)するとともに、一部について論文投稿準備中である。

(課題E)当初課題と密接に関連する課題で、本研究の中で得られた成果。E-1)

複製ストレス存在下での遺伝子増幅機構について、詳細に解明することができた。すなわち、IR/MAR遺伝子増幅法は、従来から汎用されてきたDhfr/Mtx法と組みあわせることにより、きわめて効率よく遺伝子増幅が進行する。本研究では、この機構を詳細に解明した。これは、がん細胞の中で進行する遺伝子増幅により近く、また、産業面でも有用な技術であり、その機構を解明することには大きな意義がある。そのような成果は、学会発表(7, 13)するとともに、論文発表(1)を行った。E-2) 遺伝子発現を高める配列を、直列あるいは反復配列として、IR/MAR法と組みあわせることにより、遺伝子サイレンシングを防ぎ、一遺伝子あたりの発現量を飛躍的に高めることができた。これは、課題Aで得られたG5配列や、課題Cで得られたB-3-31配列を試験管内で連結し、得られた反復配列を、目的遺伝子を持つプラスミドと同時に導入する方法である。この方法により、100 kbp近く続いた「発現を高める配列」の中に目的遺伝子が埋もれた状態となり、その構造が高度に増幅するようになる。このような成果は、学会発表(2)するとともに、知財の申請(2)を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者、及び連携研究者に下線)

(corresponding author にアスタリスク)

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Shun-suke Tanaka, Sho-hei Mitsuda, **Noriaki Shimizu*** (2014) How a Replication Origin and Matrix Attachment Region Accelerate Gene Amplification under Replication Stress in Mammalian Cells. *PLoS ONE* July 2014 | Vol. 9, no. 7, e103439 (14 pages). 査読有り
2. Naoya Okada, **Noriaki Shimizu*** (2013) Dissection of the Beta-Globin Replication-Initiation Region Reveals Specific Requirements for Replicator Elements during Gene Amplification. *PLoS ONE* Vol. 8, no. 10, e77350 (10 pages). 査読有り
3. Chiemi Noguchi, Yoshio Araki, Daisuke Miki, **Noriaki Shimizu*** (2012) Fusion of the Dhfr/Mtx and IR/MAR gene amplification methods produces a rapid and efficient method for stable recombinant protein production. *PLoS ONE*, Vol. 7, no. 12, e52990 (14 pages). 査読有り
4. Yoshio Araki, Tetsuro Hamafuji, Chiemi Noguchi and **Noriaki Shimizu*** (2012) Efficient Recombinant Production in Mammalian Cells Using a Novel IR/MAR Gene Amplification Method. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, e41787 (10 pages). 査読有り
5. Atsushi Okamoto, Koh-ichi Utani, and **Noriaki Shimizu*** (2011) DNA replication occurs in all lamina positive micronuclei, but never in lamina negative micronuclei. *Mutagenesis*, vol. 27, no. 3, page 323-327. 査読有り
6. Koh-ichi Utani, Atsushi Okamoto and **Noriaki Shimizu*** (2011) Generation of Micronuclei During Interphase by Coupling between Cytoplasmic Membrane Blebbing and Nuclear Budding. *PLoS ONE*, Volume 6, no. 11, e27233 (12 pages). 査読有り
7. Hiromitsu Yoshimura*, Shingo Sekine, Hisashi Adachi, Yoshikatsu Uematsu, Akiko Mitani, Nobuko Futaki, **Noriaki Shimizu** (2011) High-level expression of human recombinant cyclooxygenase-1 in mammalian cells using a novel gene amplification method. *Protein Expression and Purification*, vol. 80, pp41-46. 査読有り
8. Saiyu Harada, Naoki Sekiguchi, and **Noriaki Shimizu*** (2011) Amplification of a plasmid bearing a mammalian replication initiation region in chromosomal and extrachromosomal contexts. *Nucleic Acids Research*, Vol. 39, no. 3, page 958-969 査読有り

〔学会発表〕(計23件)

1. 満田 祥平, 清水 典明 「染色体外遺伝因子と染色体との間で、同じ反復配列のエピジ

エネティック状態はどのように異なるのか? (1P-0212)」**第37回日本分子生物学会**、2014年11月25日、**パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)**

2. 大崎 究, 清水 典明 「複製開始配列の逆位反復配列を用いることによる、動物細胞内で安定なエピソームの形成 (2P-0927)」**第37回日本分子生物学会**、2014年11月26日、**パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)**
3. 福間 美樹, 元明 優人, 大懸 俊廣, 三浦 理, 大山 隆, 清水 典明 「サイレンシングを受けやすい反復配列からの遺伝子発現を高めるヒトゲノム配列の単離と解析 (2P-0928)」**第37回日本分子生物学会**、2014年11月26日、**パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)**
4. 坂丸 直人, 浪花 修平, Rita Kapoor_, 宇谷 公一, 清水 典明 「ヒト染色体に由来する自律複製する染色体外遺伝因子の、細胞内維持、排出と細胞間伝播 (3P-0777)」**第37回日本分子生物学会**、2014年11月27日、**パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)**
5. 山田 拓, 小塩 結里恵, 清水 典明 「染色体外での遺伝子増幅とゲノム不安定性に与える低酸素環境の影響 (3P-0778)」**第37回日本分子生物学会**、2014年11月27日、**パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)**
6. 元明 優人, 清水 典明 「哺乳動物細胞内で、遺伝子増幅により形成された反復配列からの発現を高めるヒトゲノム配列の、単離と解析 (3P-0334)」**第36回日本分子生物学会**、2013年12月5日、**神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)**
7. 田中 俊介, 満田 祥平, 清水 典明 「複製ストレスにより誘導される遺伝子数増減の分子機構と、IR/MAR 配列の影響 (3P-0335)」**第36回日本分子生物学会**、2013年12月5日、**神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)**
8. 満田 祥平, 清水 典明 「染色体と染色体外遺伝因子の間で、クロマチンのエピジェネティック修飾状態はどのように異なるか? (3P-0336)」**第36回日本分子生物学会**、2013年12月5日、**神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)**
9. 坂丸 直人, 浪花 修平, カポール リタ, 宇谷 公一, 清水 典明 「ヒト染色体断片化による、自律複製する安定な染色体外遺伝因子の新生 (3P-0337)」**第36回日本分子生物学会**、2013年12月5日、**神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)**
10. 清水 典明 「IR/MAR 遺伝子増幅法と、蛋白質生産への応用 (招待講演)」**日本動物細胞工学会 2013年大会**、2013年7月19日、ホテルフジタ、福井県・福井市
11. 岡田直也, 清水典明 「ヒト複製開始配列

に含まれる、遺伝子増幅を指示する配列の分子解剖 (1P-0433)」**第35回日本分子生物学会、2012年** 12月11日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

12. 元明優人、清水典明「哺乳動物細胞内で、遺伝子増幅により形成された反復配列からの発現を高めるヒトゲノム配列の、単離と解析 (1P-0434)」**第35回日本分子生物学会、2012年** 12月11日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

13. 田中俊介、野口千笑、荒木義雄、清水典明「IR/MAR-Dhfr 融合遺伝子増幅法・・・安定な高発現細胞を早く生じる新規方法による、遺伝子増幅の機構 (4P-0397)」**第35回日本分子生物学会、2012年** 12月14日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

14. 浪花修平、カポール・リタ、宇谷公一、清水典明「染色体外遺伝因子の細胞内安定性を支配する遺伝的背景と、染色体断片化による新規染色体外遺伝因子の形成 (4P-0398)」**第35回日本分子生物学会、2012年** 12月14日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

15. Noriaki Shimizu, Yoshio Araki, Chiemi Noguchi and Tetsuro Hamafuji “Recombinant protein production in CHO cells using the IR/MAR-amplification based technology”The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACCT 2012) Nov.30.2012、Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan

16. 荒木 義雄、野口 千笑、清水 典明、濱藤 徹郎、能勢 博、三木大輔「IR/MAR 遺伝子増幅法を核とした、動物細胞での抗体等有用蛋白質の高効率発現系」第11回 日本蛋白質科学会年会、2011年6月7日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府・大阪市

17. Yoshio Araki, Chiemi Noguchi, Noriaki Shimizu, Tetsuro Hamafuji, Hiroshi Nose and Daisuke Miki “Application of the Novel and Convenient IR/MAR Gene Amplification Technology to the Production of Recombinant Protein Pharmaceuticals (Poster)”22nd ESACT (European Society for Animal Cell Technology) meeting at Vienna, 16, May 2011, Vienna, Austria

18. Noriaki Shimizu, Yoshio Araki, Chiemi Noguchi, Tetsuro Hamafuji and Daisuke Miki “Novel, Convenient and Efficient IR/MAR Gene Amplification Method for the Production of Recombinant Protein in Animal Cells(Oral, Invited)”10th PEACe (Protein Expression in Animal Cell) conference, 25 Sep. 2011, Cascais, Portugal

19. 清水 典明「効率的なタンパク生産技術の可能性」第11回 事業創出サロン((合)

SARR 主催)2011年11月18日、京都リサーチパーク1号館、京都府・京都市

20. 荒木義雄、野口千笑、濱藤徹郎、清水典明「IR/MAR 遺伝子増幅法を核とした動物細胞での抗体等有用蛋白質の高効率発現系 (1T13p11-1; 1P-0713)」**第34回日本分子生物学会、2011年** 12月13日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

21. 岡本敦志、宇谷公一、清水典明「ヒト細胞で悪性形質を運搬する染色体外遺伝因子を、核内から細胞質へ、さらに細胞外へと排出する機構・・・細胞質膜プレッキングの関与 (4T11a-5; 3P-0434)」**第34回日本分子生物学会、2011年** 12月15日、16日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

22. 浪花修平、Kapoor Rita、宇谷公一、清水典明「染色体外遺伝因子の細胞内安定性を支配する遺伝的背景と、染色体断片化による新規染色体外遺伝因子の形成 (3P-0433)」**第34回日本分子生物学会、2011年** 12月15日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

23. 岡田直也、荒木義雄、清水典明「ヒト複製開始領域の遺伝子増幅能を指標とした分子解剖 (3P-0435)」**第34回日本分子生物学会、2011年** 12月15日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2件)

1. 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

発明者: 清水典明

権利者: 広島大学長

種類: 特許

番号: 特願 2015-003690

出願年月日: 2015年1月9日

国内外の別: 国内

2. 名称: 哺乳動物細胞内で目的遺伝子の発現を高める方法およびキット、並びに、その利用

発明者: 清水典明

権利者: 広島大学長

種類: 特許

番号: 特願 2015-092336

出願年月日: 2015年4月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 典明 (SHIMIZU NORIAKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 10216096