

## ールシフェラーゼ遺伝子導入発光細胞についてー

### ルシフェラーゼ遺伝子の出自

**Luciferase 遺伝子の由来生物**：北米産ホタル(学名 *Photinus pyralis*)

遺伝子は pGL3-luciferase (Promega 製) です。

詳細については Promega の HP 等をご参照の上ご確認ください。

<http://www.promega.jp/resources/vector-sequences/reporter-vectors/>

から、pGL3 Basic の欄で、Genbank の ACC 番号、マップをご参照になれます。ただし、これは切り出す前のベクターであり、実際に細胞に入っている Luciferase 遺伝子は Genbank のページの CDS 88..1740 に該当すると思われます。

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U47295>

### Luciferase 遺伝子を組み込むために使用されたベクター

ルシフェラーゼ遺伝子の導入に際して用いられたベクターは次のいずれかです。細胞バンクの細胞詳細画面にて用いられたベクターをご確認ください。

- ・ pMSCV-Luc
- ・ pLVSIN-Luc
- ・ pLL3.7-CMV-Luc

#### pMSCV-Luc

レトロウイルスベクターです。

pMSCV-puro ベクターに pGL3 由来 luc DNA を挿入したものです。  
ベクターマップは、この文書の末尾の資料をご参照ください。

#### pLVSIN-Luc

レンチウイルスベクターです。

pLVSIN-Luc が用いられた細胞のうち、  
CMV-Luc 名が付された細胞の場合は、pLVSIN-CMV-pur の XhoI-XbaI 部位に pGL3 由来 luc DNA を PCR で抜き取り挿入したもの、  
EF1a-Luc 名が付された細胞の場合は、pLVSIN-EF1a pur に pGL3 由来 luc DNA を PCR で抜き取り挿入したものです。

ベクターマップはこの文書の末尾の資料をご参照ください。

#### pLL3.7-CMV-Luc ベクター

レンチウイルスベクターです。

pLL3.7 に pGL3 由来の Luc DNA を挿入したものです。  
ベクターマップはこの文書の末尾の資料をご参照ください。

このベクターでは、puromycin 耐性遺伝子が入っていません。また、Luc 挿入前のベクター-pLL3.7に入っている EGFP 遺伝子は除かれています。

### 薬剤選択について

puromycin 耐性遺伝子が入っている細胞では、セレクションはピューロマイシン 2.5~4  $\mu$ g/mL で実施できると樹立者より伺っております。しかしながら細胞種によっても薬剤感受性は異なりますので、もし選択を試みる場合には濃度を何点か振って実施してください。

安定発現株として寄託されましたので、バンクでは薬剤選択を実施していませんが、継代し続けることにより、luciferase 発現のポピュレーションの変化が起こることも考えられます。また、別の変異が入る可能性、微生物汚染等の事故により失われるおそれもございます。よく増えるようになった段階で早めに凍結ストックを作製され、状態に問題が生じたときに凍結ストックに戻れるようにすることをお勧めいたします。

### 安全性について

JCRB 細胞バンクに登録されている luciferase 遺伝子導入発光細胞では、次のいずれかのベクターが使われています。

- pMSCV-Luc レトロウイルスベクター
- pLVSIN-Luc レンチウイルスベクター
- pLL3.7-CMV-Luc レンチウイルスベクター

このうち、レンチウイルスベクターを用いて導入されたヒト細胞については、念のためリバーstransクリプターゼ検査を実施し、分譲可能な細胞は陰性を確認しています。

なお、使用されたウイルスベクターは replication incompetent なものであり、細胞への組み込み後に複製は起こりません。また、長期間の継代を経ており、時間によるウイルスの変性、希釈効果等により残存ウイルスは存在しないものとして取り扱われております。

しかしながら、親株がヒト由来の細胞である場合には、遺伝子導入とは別の問題として、当バンクでの検査非対象のウイルスが存在する可能性、未知なるウイルスの存在の可能性などが否定できませんので、原則 BSL2 での取り扱いを推奨しております。

## カルタヘナ法に関して

Luciferase 導入発光細胞株自体は「遺伝子組換え生物」に該当しません。細胞のみを取り扱う場合、組換え DNA 実験に該当せず、拡散防止レベル 2(P2)での取扱いの対象にはなりません。

一方、発光細胞を動物に移植する実験を実施する際には、外来遺伝子である luciferase を動物に導入することになりますので、その動物が「遺伝子組換え生物」に該当し、カルタヘナ法の対象となります。

### [解説]

カルタヘナ法は、遺伝子組換え生物について適用されるものです。

『遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律』の法律施行規則

において、遺伝子組換え生物の適用除外として、

(生物の定義) 第一条 の一と二

『ヒトの細胞等』

『分化する能力を有する、または分化した細胞等（個体及び配偶子を除く。）であって、自然条件において個体に成育しないもの』

は遺伝子組換えが行われたヒト等の哺乳類などの培養細胞であっても法に言う組換え生物とはみなさないことが示されています。

遺伝子導入に使われたウイルスは遺伝子組換え生物に該当しますが、replication incompetent であるため、細胞への組込み後に複製は起こらず、また、長期間の継代を経ており、時間によるウイルスの変性、希釈効果等により残存ウイルスは存在しないものとして取り扱われております。

これは細胞自体の拡散防止レベルについてのものです。

### [動物へ移植する場合]

Luc 導入発光細胞を動物に移植する場合はその実験が「動物作出実験」となり、また移植された動物は「遺伝子組み換え生物」とみなされ、カルタヘナ法の対象となります。この場合の拡散防止レベルに関しては、実験の内容と照らし合わせて、貴機関の組換え DNA 実験委員会等にご相談ください。

文科省のライフサイエンスの広場、遺伝子組換えに関する Q&A (第二種使用等) の、問 3-1 をご参照ください。

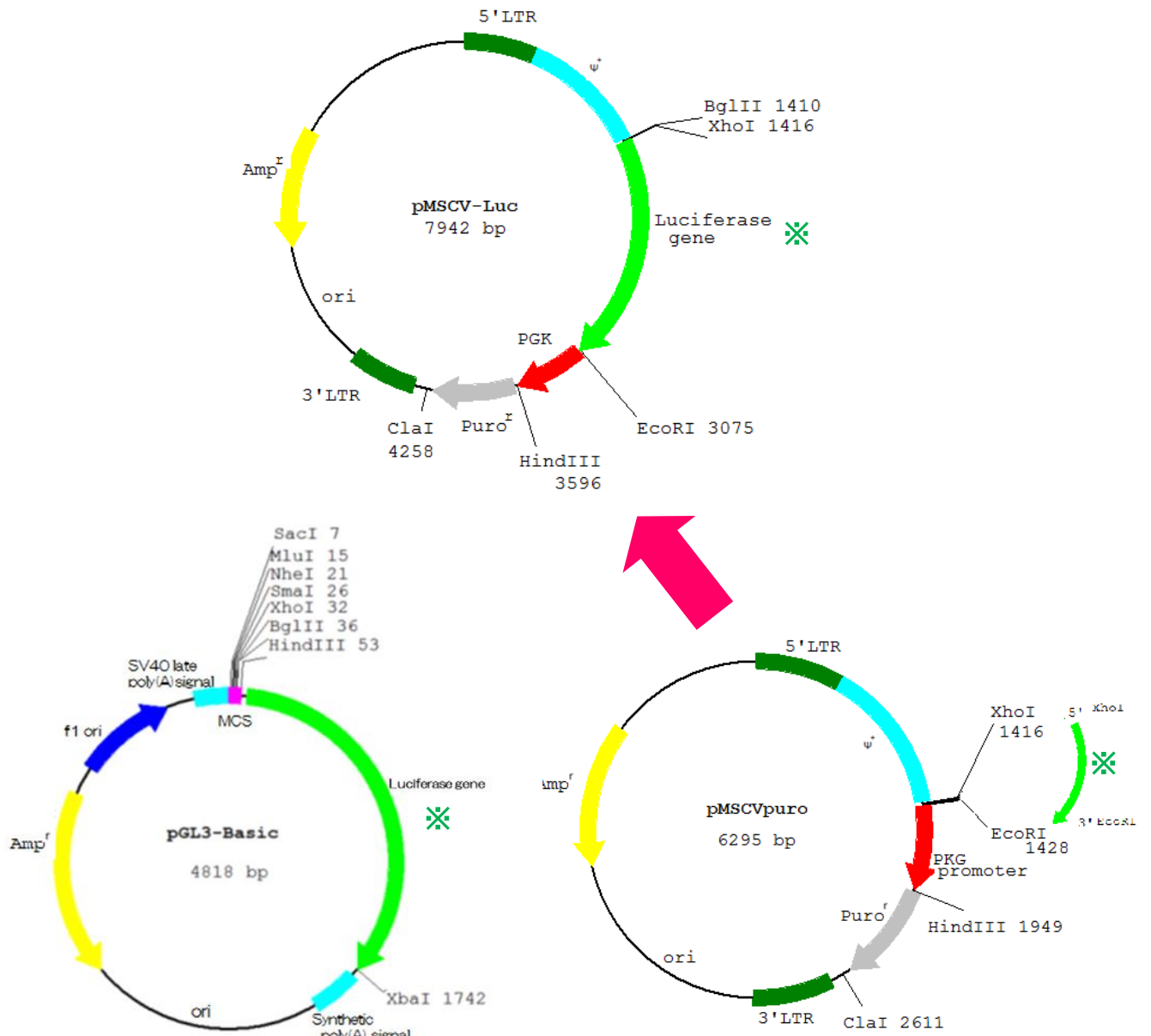
[http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen\\_faq/#1-3](http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen_faq/#1-3)

さらに詳細には、

[http://www.lifescience.mext.go.jp/files/pdf/6\\_25.pdf](http://www.lifescience.mext.go.jp/files/pdf/6_25.pdf)

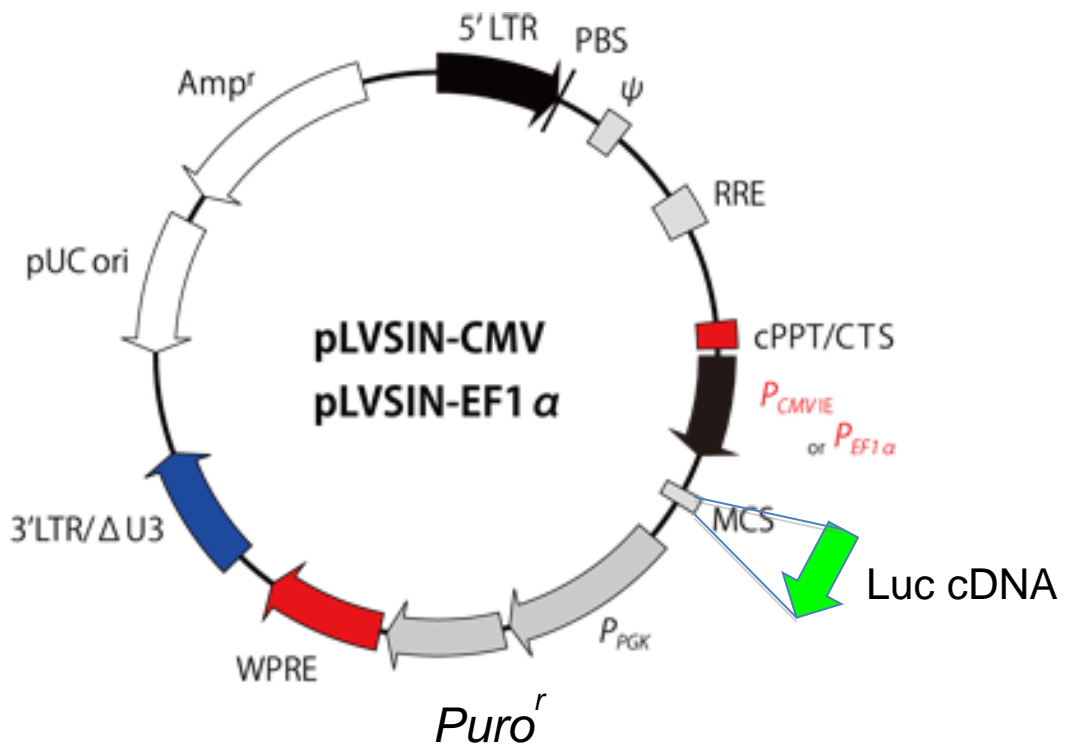
をご参照ください。

# pMSCV-Luc



✱The insert was amplified from pGL3-Luciferase using PCR

# pLVSIN-Luc



# pLL3.7-CMV-Luc

