

ここからは、ウイルスの感染のメカニズムと、表1で取り上げたウイルス・ベクターの用途や由来となるウイルスの特徴について説明していきます。

ウイルスとは

基本的にはタンパク質と核酸からなる粒子で、細胞質をもたず、代謝と自己複製を宿主細胞の機能に完全に依存。宿主によって動物ウイルス、植物ウイルス、細菌ウイルス（バクテリオファージ）に大別され、ゲノムの種類（DNA/RNAおよび一本鎖/二本鎖）で分類されます。基本構造は、核酸（RNAまたはDNA）とタンパク質から成るコアを、カプシドと呼ばれるタンパク質の殻で包んだ粒子で、数十nmから数百nmの大きさを持ちます（図1）。カプシドは、電子顕微鏡で観察可能な形態学的な構造上の基本単位であるカプソメアの集合体で、カプソメアは一般に3ないし6個のペプチドで構成されます。このコアとカプシドを併せてヌクレオカプシドと呼び、エンベロープをもたないウイルスは、ヌクレオカプシドが完全な粒子になります。ウイルスの中にはカプシドの外側に、脂質二重膜で形成されるエンベロープ（外套）を持つ物がありますが、これは宿主の細胞から出芽する際に宿主の細胞質膜や核膜の一部をまとったものであると考えられています。エンベロープ上には、スパイクあるいはスパイクと呼ばれる糖タンパク質が突出していることがあり、これはウイルスの遺伝子から作られた、そのウイルス独自のタンパク質であり、宿主細胞に吸着・侵入したり、宿主の免疫機構から逃れたりするための生理的な作用があります。

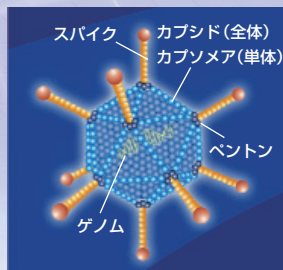


図1 ウイルスの基本構造

ウイルス感染のメカニズム

ウイルス増殖は、まず宿主細胞の表面にウイルスが吸着することで始まります。ウイルスが細胞に接触すると、ウイルスの表面にあるタンパク質が宿主細胞の表面に露出しているいずれかの分子（レセプター）を標的にして吸着します。ウイルスが感染できるかどうかは、そのウイルスに対するレセプターを宿主細胞が持っているかどうかによって依存します。次に細胞内への侵入が起こりますが、ウイルスのエンベロープが宿主の細胞膜と融合し、粒子内部のヌクレオカプシドが細胞質内に送り込まれる膜融合タイプ（エンベロープを持つウイルス）や、宿主細胞の飲食作用（エンベロープを持たないウイルス）、吸着したウイルス粒子の尾部にある管を通しての移動（バクテリオファージ）などがあります。カプシドごと細胞内に侵入したウイルスは、一旦カプシドが分解されてウイルス核酸が宿主細胞質に遊離します。ウイルス核酸の複製メカニズムはウイルスのタイプにより大きく異なりますが、基本的には、核酸の複製とウイルス・タンパク質の合成が別々に行われた後、カプソメアが核酸を包み込むようにしてカプシドを形成し、ヌクレオカプシドが作られます。その後、出芽や宿主細胞が死ぬことにより、宿主細胞外に放出されます。

レトロウイルス

プラス鎖一本鎖RNAをゲノムとし、直径が約0.1μmのエンベロープをもち、内側に直径40~60nmのヌクレオカプシドをもつウイルス。このウイルスが感染した細胞では、RNAゲノムからウイルスの持つ逆転写酵素により合成されたウイルスDNAが染色体に組み込まれます。遺伝子治療用ベクターには、レトロウイルスの一種であるマウス白血球ウイルス（MMLV: Molony Murine Leukemia Virus）を改変し、自己増殖能を奪ったものが広く用いられています。レトロウイルスは大別して、オンコウイルス（Oncovirus）、レンチウイルス（Lentivirus）、スプーマウイルス（Spumavirus）の3亜科に分類され、先述のMMLVはオンコウイルスに属します。一般的に、レトロウイルス・ベ

クターはオンコウイルス由来のウイルス・ベクターを指し、レンチウイルス・ベクターと区別するためにオンコレトロウイルス・ベクターと呼ばれることもあります。

ゲノムの基本構造は、両端に存在するLTR（Long Terminal Repeat）と、その間に挟まれる*gag*、*pol*、*env*、および5'側のLTRと*gag*の間のψ（*gag*の塩基配列の一部も含む）で構成されています。LTRは染色体DNAへの組込みに重要な役割を果たし、プロモーター/エンハンサー活性が存在します。*gag*、*pol*、*env*はそれぞれウイルス蛋白質の構造蛋白質、逆転写酵素、エンベロープ蛋白質をコードしており、ψはパッケージング・シグナル配列と呼ばれ、ウイルスゲノムRNAがウイルス粒子の中に包み込まれるときに必要な配列です。細胞質で逆転写されたレトロウイルスのDNAは宿主の核膜孔を通過できないため、染色体に組み込まれるためには核膜が消失する細胞分裂が必要不可欠になります。このため、レトロウイルス・ベクターは、非分裂系の細胞への遺伝子導入には不適ですが、それ以外の細胞で、安定的に遺伝子発現を行いたいときに最適です。

アデノウイルス

252個のカプソメアから成る正20面体のカプシドを形成し、内部には塩基性タンパク質からなるコアと、それをとりまくように直鎖二本鎖DNAがゲノムとして存在します。直径が約70~90nmの球状粒子で、エンベロープは持っていません。20面体の各頂点に位置する12個のカプソメア（ペントン）には先端に小粒子のあるスパイクが突出し、感染する細胞に吸着します。ヒトのアデノウイルスは、主にカプソメアを構成するヘキソン・タンパク質上のエピトープが決定している中和反応により、51の血清型に分けられ、更に血球凝集反応の性格などによりA~Fの6群に分類されます。B群とE群は上気道炎と角結膜炎、D群は角結膜炎、F群は胃腸炎、B群の11型は急性出血性膀胱炎との関連が解明されています。

遺伝子導入に用いられるアデノウイルスは、ウイルスの増殖に必須な初期遺伝子であるE1AおよびE1B遺伝子を欠失させてあるため、これらのE1A、E1Bを恒常的に発現している293細胞内でしか増殖できないよう設計されています。E1Aにより全てのアデノウイルスのプロモーターが活性化されるため、通常の実験に用いる培養細胞や動物個体内ではウイルスの増殖に伴う細胞死は起こりません。先のE1A、E1Bとウイルスの増殖に必須では無いE3領域を欠損させることで、約8kbの外来遺伝子を組み込むことができます。アデノウイルス・ベクターは、染色体には組み込まれないため、一過性の発現にしか利用できませんが、浮遊細胞を除く広範囲の様々な細胞に非常に効率良く遺伝子導入を行うことができます。特に、非分裂細胞や増殖停止期の細胞にも遺伝子導入が可能であることから、生体への応用も可能です。

AAV（アデノ随伴ウイルス）

パルボウイルス科Parvoviridaeのデペンドウイルス属Dependovirusのウイルスで、自立増殖できず、アデノウイルスをヘルパーとして、アデノウイルスが感染している細胞の核内で増殖します。しかし、アデノウイルスとの間にDNA塩基配列の類似性は見られません。変異原物質の存在下で宿主細胞が同調分裂を行う条件下では、ヘルパーウイルスなしで増殖することも可能です。直鎖一本鎖DNAを持ち、プラス鎖を含む粒子とマイナス鎖を含む粒子とがあり、約半数ずつ存在します。直径20nmの球状粒子で、32個のカプソメアから成る正20面体のカプシドを形成し、エンベロープは持っていません。パルボウイルスは自然界に存在するウイルスの中でも最も小さい部類に入り、そのためラテン語で「小さい」を意味する *parvus* から命名されました。

AAVベクターは、染色体への組み込みは稀ですが、非分裂細胞にも高効率で導入でき、比較的長期にわたって遺伝子が発現されるのが特徴です。また、重複感染が可能のため、複数の遺伝子を別のベクターを用いて、同じ標的細胞に導入することもできます。近年、ヒトやサルのような組織から100以上の新たなAAVの型が発見されており、また、成人の約85%でAAVに対する抗体を有していますが、ヒトに対する病原性は証明されていません。このため、生体内への直接投与に適しています。

今回の記事に関するご意見、ご質問は、当社テクニカルサービスまでお願いいたします。

Tel: 03-5821-8076

Email: jtech@stratagene.com