

■■■ 組換えアデノウイルスの話し (1) ■■■

■ RIKEN DNA Bank の特徴の一つは、豊富な組換えアデノウイルスの資材、即ち組換えアデノウイルスならびに組換えアデノウイルス作製用シャトルベクターです。組換えウイルスデータベース¹⁾ならびに DNA Bank web catalog を利用して、組換えウイルスの構築のために用いたクローンをたどることも出来ます。組換えアデノウイルスを販売する会社も少しずつ増えてきましたが、RIKEN DNA Bank のように様々な遺伝子の組換えアデノウイルスとその関連材料を扱っているバンクは他にありません²⁾。

■ RIKEN DNA Bank では組換えアデノウイルス作製法として、COS-TPC 法とクローン化ゲノム導入法を採用しています。

■ 旧来法の COS-TPC 法は、2種類の DNA を宿主細胞である HEK293 細胞に導入して組換えアデノウイルスを得ます。ひとつはウイルスゲノムのほぼ全長を持ったコスミドベクターで、E1 領域を欠失しています。もうひとつは EcoT22I (+ClaI) により制限酵素消化した末端タンパク付き Ad5-dlx ゲノム (DNA - TPC) で、E1 領域は制限酵素処理で切断されていることが期待されます。この2種類の DNA が HEK293 細胞に導入されると、細胞内相同組換えにより目的の発現ユニットを搭載した組換えアデノウイルスが産生されます。ここでの問題点は、DNA-TPC の制限酵素処理が不十分だと、DNA-TPC 由来のウイルス初期遺伝子 E1A と E1B を持った RCA が生成してきてしまうことです。RCA の分離には非常に手間がかかりますし、かりに検出限界以下でも混入していたとしたら 2 ないし 3 世代後にはほとんどが RCA positive となってしまう、目的の組換えアデノウイルスを分離することが出来なくなってしまいます。

■ そこで、作業の効率化、簡便化を目的としてウイ

ルス作製に DNA - TPC を用いる必要のない完全長ウイルスゲノムを持った it ベクター (intact termini vector) が開発されました。この it ベクターにはヒトアデノウイルス 5 型ゲノムがクローニングされていますが、E1 領域は欠損しています。従って、it (intact termini) ベクター (pAxcwit、pAxCAwtit) を用いた組換えアデノウイルス作製では自律増殖可能なアデノウイルス (RCA; Replication Competent Adenovirus) が出現しにくいということは理論的に考えて当然のことです。仮に RCA が生成するとすれば、ウイルス増殖宿主の HEK293 細胞がゲノムに持つ E1 遺伝子をウイルスが増殖過程で組換えにより獲得する場合です。この現象は極めて低い確率でしか起こらず、細胞の継代回数、ウイルスの継代回数に気をつけていればほとんど起こらないと考えられます。通常、皆様が実験にお使いになるウイルスの継代回数では全く問題がないと思われれます。では、本当にそうなのか？データとして発表されていませので今回改めて検証実験を行いました。

■ 異なるコスミド株からクローン化ゲノム導入法によって作製した GFP 発現アデノウイルス (AxCAEGFPit) 3 株について、3rd seed から 13th seed までを 6cm ディッシュの HEK293 細胞にて継代しました。これらのウイルスに RCA が発生しているかを検査しました。作製した組換えウイルスを HeLa 細胞に感染して得た cell pack よりウイルス DNA を抽出しました。E1A ならびに E1B を検出できるように設計したプライマーセットを用いて PCR により RCA の検出を試みました^{3,4)}。その結果、3 株ともに 13 代までは RCA は検出されませんでした。また、細胞観察でも 13 代まで EGFP の発現は高いレベルに保たれており、安定していました。

■ 今回使用した組換えアデノウイルス作製用 it ベクターはコスミドベースのクローンであり、取扱いにコツが必要です⁵⁾。あまり長い時間大腸菌を培養すると発現ユニットが落ちてしまったり、操作中や保存中の状態によっては DNA が切れてしまったりすることもあります。しかし、一度ウイルスになれば DNA に変異が入ったものは増えず、RCA も出現確率は非常に低く、目的ウイルスのウイルスの増殖が保たれやすいため、扱いやすいのではないかと思います。

■ 当バンクでは it ベクターやその改良版である it2 ベクターを用いて重要 cDNA 搭載組換えアデノウ

イルスを作製し、提供していく予定です。(M.T. & T.M.)

(Mail News 2006.06.30 掲載記事)

=====

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====

- 1) 組換えウイルスデータベース: http://www2.brc.riken.jp/lab/dna/v_search.php
- 2) シャトルベクターの参考記事: <http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/adenoja.html#palag6>
- 3) 検査手法の参考記事: <http://www.brc.riken.jp/lab/dna/rvd/SOP/Adv/Adv-004ja.html>
- 4) 検査手法の参考記事: <http://www.brc.riken.jp/lab/dna/rvd/SOP/Adv/adenovirus3.pdf>
- 5) コスミド取扱いの参考記事: <http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/MANUAL/technicalnotes02.pdf>