アデノウイルスを用いた簡便な遺伝子導入発現法

丸山 芳子, 長尾 拓, 黒瀬 等

要約: 組換えアデノウイルスは、優れた遺伝子導入効率を持つ遺伝子導入法として、in vitroにおける培養細胞等での遺伝子発現実験や、in vivoでの接種による動物個体での遺伝子機能の解析実験など、基礎研究の分野において様々な目的で広く用いられるようになってきている。その一方で、今まで主に行われてきた哺乳類のパッケージング細胞内での相同組換えを用いる組換えアデノウイルスベクターの作製方法では、作製に多くの複雑な技術と長い期間とが必要であり、作製はそれほど容易なものではなかった。ところが、ここ数年の間に、そのような問題点を解決したともいえる改良された革新的な作製方法が次々と報告され、注目を浴びている。そこで、本稿では今までのように哺乳類のパッケージング細胞内での相同組換えを用いず、今までの方法よりはるかに簡単に組換えアデノウイルスを作製する方法をとりあげ、そのうちの1つについて実際作製する上でのプロトコールも含めて詳細に述べることにする。

1. はじめに

近年、基礎研究の場での遺伝子発現実験や臨床における遺伝子治療に利用される非増殖性組換え型ウイルスの開発はめざましく進んで、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、HIVなど様々なウイルスベクターが用いられるようになってとともに、絶え間なく改良が積み重ねられてきた。その中でも特に組換えアデノウイルスの作製法はここ数年間に画期的なまでに改良が進み、高い発現効率を持つ遺伝子導入法として高い注目を浴び広く普及しつつある。これは、組換えアデノウイルスが他の種類の組換えウイルスのみならず、他の汎用されるトランスフェクション法に比べても、はるかに優れた一過性の遺伝子導入法であることによる。具体

的な理由としては、1. 広範囲の組織や細胞に対して遺伝子導入が可能であり、2. 遺伝子導入が細胞分裂に依存的なものでないことから分裂期にある細胞だけでなく初代培養細胞を含む静止期にある細胞でも高い発現効率を示す(細胞の種類によらずほぼ100%といわれている。血球系の細胞には入りにくいとされているが、改善された方法も報告されている(1))、また、3. in vitroに限らずin vivoでも用いることが可能な高い力価の組換えウイルスを比較的効率よく簡単に得られる、といったアデノウイルスの生物学的特徴が利点になっているためである。そこで本稿では組換えアデノウイルスの簡単な概要と近年開発された画期的な作製法の1つを詳細なプロトコールとともに紹介する。

①アデノウイルスとは

アデノウイルスはエンベロープタンパクを持たない正二十面体構造をした直径約70 nmほどのウイルスで、そのキャプシッドタンパクは240のヘキソンと12のペントンおよびファイバータンパクより成っている。約36 kbの二重鎖線状DNAの両端に末端逆方向繰り返し配列(inverted terminal repeat, ITR)がついた形のゲノムを持ち(2)、これには初期に発現する遺伝子(E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4)と後期に発現する遺伝子(L1~L5)がコードされている。アデノウイルスは小児風邪、呼吸器系疾患や流行性角結膜炎などの病原ウイルスで、感染すると細胞内で効率よく複製増殖する。感染時には細胞表面にある受容体(coxsackievirus and adenovirus receptor, CAR)とインテグリン($\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$)を介してエンドサイトーシスされ、ウイルス自身のDNA合成を行う前にウイルスの増殖に必須の初期遺伝子(E1~E4)を発現した後、複製増殖および後期遺伝子(主にウイルスを構成するタンパク質の遺伝子)の発現が行われる(3)。

②非増殖性組換えアデノウイルスについて

組換えアデノウイルスを構成するベクターのDNAは、ほとんどの場合アデノウイルス2型あるいは5型由来のゲノムDNAが用いられる。組換えアデノウイルスベクター

キーワード: 組換えアデノウイルス, 遺伝子導入
東京大学大学院薬学系研究科薬効安全性学教室
(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)
e-mail: kurose@mol.f.u-tokyo.ac.jp
原稿受領日: 2000年9月6日, 企画教育委員会依頼原稿

は、アデノウイルスのゲノムのうち、感染後最も初期に発現する初期遺伝子 (E1, E3 あるいは E1, E3, E4) 領域を削除することにより、この削除した部位に発現させたい目的の cDNA (サイズは前者では 7.5 kb 以内、後者では 10 kb 以内) を組み込むことができるようにしてある。また、E1 領域を欠損させることにより増殖性が失われるので組換えアデノウイルスは感染しても通常の細胞では増殖できないことから、組換えウイルスの作製には E1 領域をトランスに供給できる細胞 (HEK293 細胞など) を用いる (E4 領域を欠損させたベクターでは E1 領域だけでなく E4 領域も供給できる細胞を用いる必要がある)。したがって、増殖性を持たない組換えアデノウイルスは、普通の細胞に感染すると、そのゲノムを宿主細胞の核内に注入し (宿主細胞のゲノムには組み込まれない)、宿主細胞にほとんど影響を与えずに目的 cDNA を発現する一過性の発現ベクターとして働く。ところが近年、上記のようなアデノウイルスベクターを用いて *in vivo* で遺伝子発現を行った場合、ウイルス由来のタンパク質の微量な発現が細胞毒性や細胞障害性 T 細胞の誘導を引き起こすことが問題になってきた。この点を克服するため、E1, E3 領域に加えて E2 領域を欠損させたベクターや、アデノウイルスのゲノム全体を削除して約 36 kb までのサイズを持つ目的 cDNA を挿入可能にする代わりに、ウイルス由来のタンパク質をヘルパーウイルスから供給させてウイルスを作製するヘルパー依存型ウイルスベクター (gutless vector) などとも開発されている (4, 5)。

③組換えアデノウイルスの作製法

組換えアデノウイルスの作製には現在まで 2 通りのアプローチがなされてきた (6)。1 つめは、アデノウイルスのゲノム DNA フラグメントを、制限酵素で切断した導入遺伝子を含むフラグメントに、ライゲーションにより直接つなぐという手法である。しかし巨大な DNA フラグメントのライゲーションが低効率であることや、ユニークな制限酵素部位が少ないことから、技術的にかなり困難であった。2 つめのアプローチは、E1 領域をトランスに供給できる哺乳類の細胞 (いわゆるパッケージング細胞) 内における相同組換えの過程を含むものである。このアプローチに基づく作製法は、欧米で Graham らが開発した方法 (7) や、日本でその後 COS-TPC 法として相同組換えの効率が大きく改善された方法 (8) が、広く普及している (COS-TPC 法は TaKaRa よりキットで販売されている)。しかしながら、目的の組換えウイルスを得るには、パッケージング細胞内からできてくる個々のプラークのスクリーニングや精製を繰り返し行う必要がある、相同組換えの効率が低い、ウイルスの作製に長期間を要する、などといった問

題点が、アデノウイルスベクターの技術を使用する上で障害になってきた。

ここ数年の間に、上記のような問題点を解決し得るような、組換えアデノウイルスの作製法を含むいくつかの技術的および概念的な進歩・改良が報告された (6, 9~12)。ここでは簡単に 2 つの方法を紹介する。ひとつは、*in vitro* ライゲーションに基づいた方法で (11, 12)、9~11 bp 以上を認識する制限酵素を用いることで今まで非常に困難であったウイルスゲノムへの目的導入遺伝子の挿入を *in vitro* ライゲーションで行うことが可能になり、得られたライゲーション産物を制限酵素で切断し直線化して HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより組換えアデノウイルスを得ることができる、というものである (CLONTECH よりキットとして販売)。もう一つは、本稿で後に紹介するものであるが、アデノウイルスのゲノムのほとんどを含むバックボーンベクターを、酵素を用いる操作なしにスーパーコイルの状態で扱うようにして、相同組換えを (哺乳類の細胞内ではなく) 大腸菌内で機械的に高い効率で行うことを可能にし、相同組換えによって得られた目的遺伝子を含む環状のアデノウイルスベクターを制限酵素により直線化して、HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより組換えアデノウイルスを得ることができる (6)、というものである (一部が QUANTUM よりキットとして販売)。またこの方法では、1 つのウイルスベクターにいくつもの導入遺伝子を入れてそれを同時に発現させることも可能になったため、アデノウイルスのバックボーンベクターに目的遺伝子とともに挿入した green fluorescent protein (GFP) により、直接、トランスフェクションやインフェクションの効率を観察できるようになった (6)。上記の 2 つの方法は、以上のような改良により、プラークのスクリーニングを行う必要がなくなって、ウイルスを作製するのに要する時間が大幅に短縮されたことから、今までの方法と比較するとはるかに高い効率で容易にウイルスの作製を行うことができるシステムとして確立されたものであると言えるだろう。

④組換えアデノウイルスを使用する上での基本的な注意事項

1. P2 レベル以上の施設で使用する。
2. 組換えアデノウイルスは熱、界面活性剤、UV など容易に不活性化される。汚染した場合 (手につけてしまった、クリーンベンチ内でこぼした、等) には界面活性剤 (10% SDS など) で洗うなどの処置をする。また、ウイルスの入っている培養液などは熱や界面活性剤で不活化させてから捨てる。
3. マイクロピペットにつけるチップはウイルス液を吸い

込んだ場合に汚染する可能性が高いので、フィルターチップを用いて汚染を防ぐとともに、他の細胞やウイルスとの間でのコンタミネーションを防ぐ。

4. 組換えアデノウイルスは HEK293 細胞などのパッケージング細胞以外では増殖しないが、手についたり吸い込んだりした場合、ウイルスが付着した手などの細胞では組換えアデノウイルスが感染し、組み込んだ目的 cDNA 由来のタンパク質が発現する。したがって、発現する目的タンパク質が毒性を持つような場合、あるいは oncogene である場合などは、特に取り扱いに注意したほうがよい。また、目的タンパク質が直接毒性を持たなくても、体の細胞で発現した場合、抗原抗体反応などが起こる可能性も十分考えられるので、扱いには充分注意する。

2. プロトコール

以下の作製方法は参考文献 6 に基づき、いくつか作業および操作上の点において当研究室で多少の修飾や改良を加えたものである。作製方法のアウトラインを図 1 に示した。また、用いるアデノウイルスのバックボーンベクターおよびシャトルベクターの構造を図 2 に示す。

① シャトルベクタープラスミドへの目的 cDNA の組み込み

発現させたい目的の cDNA を、用途にあうシャトルベクタープラスミドへサブクローニングする。【注 1】

【注 1】アデノウイルスのバックボーンベクターは ampicillin 耐性、シャトルベクタープラスミドは全て kanamycin 耐性遺伝子が組み込まれているので、選択に用いる薬剤を間違えないようにする。

② 大腸菌内での組換えアデノウイルスプラスミドの作製

1. 目的 cDNA の組み込まれたシャトルベクタープラスミド約 100 ng~1 μ g (通常の miniprep で取れる量のおおよそ 1/5 程度) を *Pme*I により切断し直線化する。*Pme*I での切断後、アガロースゲル電気泳動、バンドの切り出し、フェノール・クロロホルム処理および、エタノール沈殿を行い、5.0 μ l の滅菌水に懸濁する。【注 2】
2. ステップ 1 で調製した直線化したシャトルベクタープラスミドの懸濁液 5.0 μ l に、アデノウイルスのバックボーンベクター 1.0 μ l (約 100 ng/ μ l) と electrocompetent な BJ5183 20 μ l とを加えて、2.0 mm キュベット中で、2500 V, 200 Ω , 250 μ FD の条件下、Bio-Rad Gene Pulser electroporator を用いてエレクトロポレーションすることにより、co-transformation を行う。エレクトロポレーション後、すぐに 500 μ l の LB 培地 (kanamycin および ampicillin を含まない) に懸濁して 37℃

で 20 分間培養した後、4 枚の LB (+50 μ g/ml kanamycin) プレートにまいて、37℃ で 1 晩培養する。

3. 翌日、数個 (4 個~10 個) の小さいコロニーを拾って (なるべく小さいものから拾う)、LB 培地 (+50 μ g/ml kanamycin) 5 ml 中で 1 晩培養する。
4. miniprep でプラスミドを精製し【注 3】、0.8% アガロースゲル電気泳動により、スーパーコイルの状態でのプラスミドのサイズを調べ、約 35 kb のサイズのものを相同組換えの起こったクローンとして選ぶ。さらに、*Pac*I による切断パターンを調べ、約 30 kb と 3.0 kb (あるいは 4.5 kb) のフラグメントができることを確認する。実例を図 3 に示す。また、ここで組換えプラスミドとして選んだクローンに目的 cDNA が組み込まれていることを PCR で確認してもよい。
5. 得られた組換えアデノウイルスプラスミドを DH10B (あるいは STBL2 など) ヘトランスフォーメーションし、市販のプラスミド精製キットを用いて (当研究室では QIAGEN のものを用いている) HEK293 細胞へのトランスフェクション用に精製する。【注 4】

【注 2】ステップ 1 でシャトルベクタープラスミドを *Pme*I で切断後、アガロースゲルで精製している。ゲルにより精製しなくても組換えプラスミドは得られるが、翌日プレートに生えるコロニーの数が非常に多くなってコロニーが拾いにくくなったり、拾ったクローンが組換えプラスミドである確率が低くなったりすることが多い。

【注 3】ステップ 4 で miniprep を行うが、ここでは市販されている miniprep 調製用のキットは使わずに通常の miniprep を行ったほうが収率がよい。miniprep については Cold Spring Harbor Laboratory Press より出版されている Molecular Cloning のページ 1.25~1.28 を参照のこと (但し、オプションとなっているフェノール・クロロホルム処理は必ず行う)。また、通常は培養した大腸菌液 5 ml のうちの 1.5 ml を用いるが、プラスミドの収量を上げるために菌液 5 ml を全て使い、プラスミド調製用溶液の量は 1.5 ml 相当のままで行う。

【注 4】ステップ 5 で得られた組換えプラスミドを再び DH10B などにトランスフォームしてトランスフェクション用に精製する。このときなぜかよくわからないが、精製し終わったときにもとの組換えプラスミドと明らかに違うものが取れてくることがある (サイズが非常に小さくなっていたりする) ので、精製し終わったら再び *Pac*I による切断パターンを調べたほうがよい。このようなことを防ぐために当研究室では、ウイルスの不安定な配列や繰り返し配列などでも安定した複製を行える competent cell の大腸菌株である STBL2 (GIBCO BRL より

Fig. 1 Outline of the protocol for generating recombinant adenoviruses

Fig. 2 Adenoviral back bone vectors (pAdEasy-1 and pAdEasy-2) and shuttle vectors (pShuttle, pShuttle-CMV, pAdTrack and pAdTrack-CMV). pAdEasy-1 is constructed by all adenovirus serotype 5 genes with deletion of E1 and E3 genes, and pAdEasy-2 is constructed with an additional deletion of E4 gene. Using pAdEasy-1, capacity of transgenes is up to 7.5 kb and pAdEasy-2, up to 10 kb. For viral production, in the case of pAdEasy-1, packaging lines expressing adenovirus E1 genes are needed and in the same way, in the case of pAdEasy-2, adenovirus E1 and E4 genes expressing cell lines are required. As pAdTrack based shuttle vectors contain the GFP gene, viral production can be monitored by GFP expression after transfection of recombinant adenovirus DNA into HEK293 packaging cells.

Fig. 3 Screening of the recombinants generated in *E. coli* BJ5183 by agarose gel electrophoresis. The DNAs were subjected to electrophoresis through a 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide. (A) Supercoiled form of 4 different dynamin-pAdTrack-CMV-pAdEasy-1 clones is shown. Based on the size of DNA, clones 1 and 2 were potential recombinants. Clones 3 and 4 were not recombinants. They were probably dynamin-pAdTrack-CMV clones. (B) Restriction enzyme digestion analysis with *PacI*. Candidate clones 1 and 2 were digested by *PacI*. As both clones yielded two fragments of about 30 kb and 4.5 kb, they were positive.

販売)を使っている。通常、500 ml の大腸菌培養液から 200 μ g ぐらいの組換えプラスミドが得られる。

③HEK293 細胞におけるウイルスの産生

1. トランスフェクション当日にコラーゲンコート 25 cm² フラスコに 50~70% confluent となるように HEK293 細胞を用意する。【注 5】
2. 得られた組換えアデノウイルスプラスミド 4~5 μ g を *PacI* で切断した後、フェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行い 20 μ l の滅菌水に溶解する。
3. Superfect Transfection Reagent (QIAGEN より販売) を用い添付されているプロトコールに従って、HEK293

細胞へトランスフェクションを行う。【注 6】

4. 20 μ l の滅菌水に溶解してある *PacI* で切断したプラスミドに、160 μ l の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO BRL より販売)、血清および抗生物質を含まない)を加えて混ぜた後、Superfect Transfection Reagent 36 μ l を加えビペッティングによりよく混合して、5~10 分間室温でインキュベートする。その間にフラスコ中の培養液を除き細胞を PBS で洗っておく。
5. DMEM (10% ウシ胎仔血清 (FBS), 100 μ g/ml Gentamicin) 1.2 ml を先ほどの混合溶液に加えてよく混ぜ、その全量をフラスコ中の細胞に加えて、37℃ の CO₂ インキュベーター中で 2 時間培養する。
6. 2 時間後、トランスフェクション混合液を除き、細胞を PBS で洗って 5 ml の DMEM (10% FBS, 100 μ g/ml Gentamicin) を加え、37℃ で 7 日間~10 日間培養する。
7. シャトルベクタープラスミドに pAdTrack あるいは pAdTrack-CMV を用いている場合は、トランスフェクションの翌日、GFP の発現を顕微鏡下で観察しトランスフェクションの結果を確認する。また、ウイルスの産生状況も日を追って GFP の発現の増加により顕微鏡下で観察できる。【注 7】図 4 にトランスフェクションより 1, 4, 7, 10 日後における GFP の発現の様子を示した。
8. トランスフェクションより 7 日~10 日後、セルスクレイパーでフラスコから細胞を剥がして培養液ごと 15 ml のコニカルチューブに回収し、dry ice/methanol bath 中で凍結させた後、37℃ の水中で素早く融解させて激しくボルテックスするという凍結融解の操作を 4 回行って、細胞を破碎する。3000 rpm で 15 分間遠心して (室温でもよい) 細胞の破片をペレットとして除き、上清を 1 次シードウイルス液 (約 5 ml) として回収し、-80℃ で保存する。
9. インフェクション当日にコラーゲンコート 25 cm² フラスコに 50~70% confluent となるように HEK293 細胞を用意しておき、1 次シードウイルス液 1~2 ml を用いてインフェクションを行う。インフェクションの方法については、以下に述べるアデノウイルスの細胞への感染の項を参照。インフェクションの翌日、GFP の発現を顕微鏡下で観察するとほとんどの細胞で GFP を発現しているのが確認できる。
10. インフェクションより 2~4 日後、半分くらいの細胞が変性して剥がれてきたところで、ステップ 8 と同様の操作を行い、セルスクレイパーでフラスコから細胞を剥がして培養液と共に回収して、凍結融解を 4 回行い、遠心した上清を 2 次シードウイルス液 (約 5 ml) とする。ここで 2 次シードウイルス液を用い、PCR または West-

Fig. 4 Adenoviral production monitored by GFP after transfection into HEK 293 cells. *PacI*-digested dynamin-pAdTrack-CMV-pAdEasy-1 was transfected into HEK 293 cells, and GFP expression was visualized with confocal microscopy at the indicated time. On the day after transfection, GFP were slightly observed, and GFP expression became apparent as the day passed. After 7-10 days, cells were detached, and almost all of the cells were producing viruses.

ern blotting を行って、得られた組換えアデノウイルスが目的とする cDNA を発現しているかどうか確認しておく。【注 8】

11. 同様にして、今度はコラーゲンコート 75 cm² フラスコに HEK293 細胞を用意し、2 次シードウイルス液 500 ~ 1000 μ l を用いてインフェクションを行い、3 次シードウイルス液（約 15 ml）を得る。【注 9】

【注 5】 HEK293 細胞は通常の培養にはコラーゲンコートされていない普通の培養用フラスコなどを用い、アデノウイルスを感染させる時にのみコラーゲンコートのもの

を用いる。また、HEK293 細胞を継代するときは、PBS（+0.5 mM EDTA）中に数分間放置することで細胞を剥がす。遠心は 500 rpm、3 分間で行い、回転数をあまり上げないように注意する。

【注 6】 ここで Superfect を用いているのは、細胞に対する毒性が低く、効率の高い確実なトランスフェクションが可能のためである。したがって、好みによってリン酸カルシウム法やリポフェクション法を用いてもよい。

【注 7】 GFP の発現が観察されなくてもウイルスが生成している場合がある（GFP をコードした部分が腸菌内

Fig. 5 Recombinant adenovirus-mediated GFP expression in primary neonatal rat cardiomyocytes. (A) GFP expression at each MOI (a MOI of 0, 5, 10, 30, 50, and 100) was observed with confocal microscopy 48 h after infection. As MOI became higher, the cells expressing GFP increased. At MOI of 100, almost 100% of the cells expressed a significant amount of GFP. (B) Expression of GFP at each MOI was compared by Western blotting. Forty eight h after infection, cells were collected and 40 μ g protein per lane were used for SDS-PAGE. Proteins including GFP were transferred to a nitrocellulose membrane, and GFP was detected by anti-GFP polyclonal antibody (CLONTECH).

Table 1 List of the adenoviruses we generated in the last year.

Adenovirus	Function
GFP	green fluorescence protein
β ARK1	β adrenergic receptor kinase 1
β_1 AR	β_1 adrenergic receptor
β_2 AR	β_2 adrenergic receptor
A ₁ R	adenosine A ₁ receptor
β ARK1-ct	peptide coding carboxyl terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 (β ARK1) trap G $\beta\gamma$ and inhibit the function of G $\beta\gamma$
phosducin	trap G $\beta\gamma$ and inhibit the function of G $\beta\gamma$
transducin	trap G $\beta\gamma$ and inhibit the function of G $\beta\gamma$
G12V-rac1	constitutively active mutant of rac1
T17N-rac1	dominant negative mutant of rac1
wt-ras	wild type of ras
G12V-ras	constitutively active mutant of ras
S17N-ras	dominant negative mutant of ras
G14V-rhoA	constitutively active mutant of rho
T19N-rhoA	dominant negative mutant of rho
wt-G α_q	wild type of G α_q
R183C-G α_q	constitutively active mutant of G α_q
RGS4	regulator of G protein signaling 4
GRK2-Nt	peptide coding amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 act as RGS of G α_q and G α_{11}
p115-RGS	peptide coding RGS domain of p115RhoGEF work as RGS of G α_{12} and G α_{13}
G α_s -ct	peptide coding carboxyl terminus of G α_s inhibit G α_s from coupling with each receptor
G α_{12} -ct	peptide coding carboxyl terminus of G α_{12} inhibit G α_{12} from coupling with each receptor
G α_q -ct	peptide coding carboxyl terminus of G α_q inhibit G α_q from coupling with each receptor
G α_{12} -ct	peptide coding carboxyl terminus of G α_{12} inhibit G α_{12} from coupling with each receptor
G α_{13} -ct	peptide coding carboxyl terminus of G α_{13} inhibit G α_{13} from coupling with each receptor
AGS3	activator of G protein signaling 3

での相同組換えによって欠失することがあるため) ので、2 次シードウイルスの調製 (ステップ 10) までは続けて行う。

【注 8】得られたウイルスのうち最低でも 95% 以上が目的の cDNA を発現している (6) ので、ほとんどの場合は特にブラークのスクリーニングを行う必要はない。ただし、in vivo での用途に用いる場合はブラークのスクリーニングを行うことが望ましいとされている。

【注 9】5 ml 以上の液量で凍結融解を行うときには必ず 5 ml ずつ 15 ml のコニカルチューブに分注してから凍結融解の操作を行う。液量が多いと凍結融解にかかる時間が増し、その分だけウイルスが失活することになる。

【注 10】3 次シードウイルス液ではウイルスの力価は多くの場合およそ 10^8 pfu (plaque forming unit)/ml 前後であることが多い。これよりさらにウイルス力価を上げた

いは、3 次シードウイルス液を用いて 4 次シードウイルス液を作るか、ウイルス液を濃縮する。また、組み込んだ目的の cDNA によっては 3 次シードウイルス液、4 次シードウイルス液とアンプリファイしていてもウイルス力価は $10^6 \sim 10^7$ 程度にとどまってそれ以上上がらないものもある。そこでこのような場合には、通常のウイルス回収時のように培養液を細胞と共に回収してその培養液ごと凍結融解を行うのではなく、細胞と培養液とを回収した後、遠心して細胞をペレットにし、上清の培養液を捨て、最小限の液量 (培養液あるいは PBS) に細胞を懸濁し直してから凍結融解を行って再び遠心しその上清を回収する。3 次シードウイルス液や 4 次シードウイルス液は通常では約 15 ml 得られるが、これにより 1~2 ml 程度まで濃縮できることになり、ウイルス力価も $10^8 \sim 10^{10}$ pfu/ml 程度まで上げることができる。細

胞がウイルスによって変性し剥がれた後でも、ウイルスのほとんどは（培養液中ではなく）細胞の核内にあるので培養液を捨てても細胞を回収すれば全く問題はない。

【注11】 *in vitro* において培養細胞等での発現実験に用いる場合は上記のような方法で得た3次シードウイルス液または4次シードウイルス液で充分である。一方、*in vivo* での用途に用いる場合には、培養液、血清、発現した目的タンパク質、HEK293細胞やウイルス由来のタンパク質などが混入していない純粋な高力価のウイルス液が必要となるので、CsClを用いた密度勾配遠心によりウイルスを精製濃縮純化する必要がある。

【注12】 目的のcDNAによっては、直線化した組換えプラスミドをHEK293細胞へトランスフェクションしてもまったくウイルスが産生されないことがある。これはHEK293細胞内でウイルスの産生と共に発現してくる目的cDNAの影響であると考えられている。そのような場合は、部位特異的組換え酵素 Cre を用いた Cre/*loxP* システム(13) や、テトラサイクリンによりコントロールされる transactivator とプロモーターで制御される系(14)（テトラサイクリンによる発現制御システムに基づいた組換えアデノウイルス作製キットが CLONTECH より販売されている）など、目的cDNAによるタンパク質の発現スイッチをオフにした状態で HEK293細胞内でのウイルス産生が行えるようにし、培養細胞などで目的の実験を行う際にのみ、発現のスイッチをオンにして感染させた組換えウイルスから目的タンパク質を発現するような、完全な発現制御を行うことができるシステムに基づいて組換えアデノウイルスを作製する必要がある。また、このような発現システムは、*in vitro* においてだけでなく、正確な発現制御を要する *in vivo* での組織特異的な発現などにも有効である(15)。

④ウイルス力価 (titer) の測定(16)

1. HEK293細胞を10 cm プレート1枚分用意しておく。
2. 作製した組換えアデノウイルス液を 10^{-1} ~ 10^{-4} まで DMEM (5%FBS) を用いて段階希釈する（濃縮などにより高力価が予想される場合には 10^{-5} まで希釈する）。チップは希釈のたびに新しいものに換える。再現性良く力価を測定するためには、希釈のたびに新しいチップに交換することが必要である。
3. コラーゲンコート 96 ウェル (well) プレート1枚の全ての well に DMEM (5%FBS) 50 μ l を入れる。
4. 96 well プレートの第1列目に 10^{-4} （濃縮などにより高力価が予想される場合には 10^{-5} ）に希釈したウイルス液を加える。
5. 8 well 用マルチチャンネルピペットを用いて、25 μ l を2

列目に移し、以下同じ操作を11列目まで繰り返して、最後の25 μ l を捨て、12列目は非感染細胞のコントロールとする。このとき用いるチップは希釈のたびに換える。繰り返しになるが、チップの交換は必ず行う。

6. 用意しておいた10 cm プレートの HEK293細胞を PBS (+0.5 mM EDTA) で剥がし、DMEM (5%FBS) に懸濁する。この細胞溶液 50 μ l を全ての well に加える。チップは1回ごとに換える。
7. 3~4日後と、6~8日後に各 well に DMEM (5%FBS または 10%FBS) 50 μ l を加える。
8. 12日後~14日後に細胞変性の終末点を顕微鏡下で判定し、以下に述べるゲルバーの式を用いて50%細胞変性終末点 (50% Tissue Culture Infectious Dose, TCID₅₀) を計算する。

ゲルバーの式；求める50%細胞変性点を 10^x とすると、 $a=1$ 列目の希釈度として $x = \log a - (\text{各段階希釈における変性 well 数} / \text{検体数の総和} - 0.5) \times \log (\text{希釈率})$

下に96 well での実験結果を例として示す。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
B	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
C	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
D	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○
E	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
F	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
G	●	●	●	●	●	●	●	◎	●	○	○	○
H	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
有効数	8	8	8	8	8	8	8	5	2	0	0	0

●：ウイルスによる細胞変性が50%以上，○：ウイルスによる細胞変性が50%以下，◎：希釈系列上でとんで変性が現れたところは有効としない（Gの10）

$$x = \log(10^{-4} \times 3^{-1}) - (8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 5/8 + 2/8 - 0.5) \times \log 3 = -8.00$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-8.00}$$

$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = \text{pfu}/\text{ml}$ であることから、希釈ウイルス液は50 μ l であるので、ウイルス原液の力価は $1 \text{ ml} \div 50 \mu\text{l} \div 10^{-8.00} = 10^{9.30} = 1.98 \times 10^9 \text{ pfu}/\text{ml}$ となる。

⑤アデノウイルスの細胞への感染

1. 3次シードウイルス液または4次シードウイルス液を30~500 MOI【注13】程度になるように通常用いる培養液（無血清あるいは5%FBS）で希釈し、培養液を除いて、希釈した組換えウイルス液を細胞にかける（適用する MOI 数は、実験の目的と用いる細胞に最適な数値を事前に検討しておく）。このとき細胞にかけるウイルス液は、ウイルスの濃度をできるだけ濃く保ったまま細胞

が乾かない程度の液量に希釈されていることが望ましい。

2. 細胞にウイルス液をかけた後、細胞を乾かさないようにするためにフラスコやディッシュをシーソーのようにゆっくりと振って、ウイルス液をまんべんなく行き渡らせる。この操作を20分おきに3回～6回（1時間～2時間）行い、この間細胞はCO₂インキュベーターの中に置いておく。

3. 終わったら、ウイルス液を除かずに通常用いている血清濃度の培養液を加えるか、または、ウイルス液を除いて細胞をPBSなどで洗ってから培養液を加え、24時間～48時間細胞を培養し、解析に用いる。図5にラット新生仔心室筋細胞での組換えアデノウイルスによるGFPの発現を、共焦点レーザー顕微鏡とWesternにより観察した結果を示した。

【注13】MOIとはmultiplicity of infectionの略で1つの細胞を感染させるために用いられるウイルス粒子の数と定義される。例えば、10⁶個の細胞に30 MOIで感染させた場合、30×10⁶=3×10⁷のウイルス粒子（力価が1.98×10⁹ pfu/mlのウイルス液なら15 μl）を用いたことを意味している。

⑥electrocompetent bacteria cell (BJ5183, DH10B など) の調製法

1. 凍結してある大腸菌のストックからLB培地10 mlに植えて37℃で一晩振盪培養する。【注14】
2. 250 μlの大腸菌液を250 mlのLB培地に希釈し、125 mlずつ2本の1リットルフラスコに分けて、OD₅₅₀値がだいたい0.8程度になるまで4～5時間37℃で振盪培養する。
3. 菌液を数本の50 mlの遠心チューブに入れ、氷上で1時間から4時間インキュベートする（長く氷上でインキュベートするほど高いcompetencyを持った大腸菌が得られる）。
4. 3000 rpm, 4℃で20分間遠心し、菌体をペレットにする。
5. 菌体のペレットを、総量200 mlのあらかじめ滅菌後氷冷してある10%グリセロールに懸濁することによりよく洗う。
6. 菌体を懸濁した10%グリセロール溶液を3000 rpm, 4℃で30分間遠心し、菌体をペレットにする。
7. ステップ5と6を繰り返す。この段階で1本のチューブにまとめる。
8. 約5 mlほどを残して上清を捨て、ペレット全体をこの残した上清に懸濁し、3000 rpm, 4℃で10分間遠心する。
9. 上清を約1.5 ml程度残して捨て、この残した上清に菌体を懸濁する。

10. あらかじめ氷冷しておいたチューブに50 μlずつ分注する。

【注14】ここで用いるLB培地はampicillinやkanamycinを含まないことに注意する。但し、BJ5183を調製するときは、他の大腸菌のコンタミネーションを厳密に防ぐために、通常のLB培地に30 μg/mlの濃度でストレプトマイシンを加えて培養する。

3. 終わりに

従来、神経細胞や心筋細胞、初代培養細胞においては通常のトランスフェクション法では遺伝子導入効率が低く、この遺伝子導入効率の低さが遺伝子発現研究を行う際の障害となってきたため、そのような細胞へほぼ100%の効率で遺伝子導入を可能にするアデノウイルスベクター系は非常に有用な系として常に注目を浴びてきた。さらに、この2, 3年間でウイルスの作製法は大幅な改良・簡略化が進んだことから、組換えアデノウイルスはさらなる脚光を浴びて、一過性トランスフェクション法の選択肢の1つとしてますます普及していくことになると予想できる。ここで述べた方法は、基本的なDNAの取り扱いと細胞培養の経験のある実験者なら誰でも短期間にウイルスを作製できるプロトコルである。本稿がこれから初めて組換えアデノウイルスを作製しようとする方々の一助となれば幸いである。

当研究室で用いているアデノウイルス作製のベクターはJohns Hopkins Oncology CenterおよびHoward Hughes Medical InstituteのTong-Chuan He氏（文献6の著者）らより供与されたものである。これらのベクターの授受や詳細に関する情報は、文献6の著者らが開いているサイト<http://www.coloncancer.org/adeasy.htm>にアクセスすることにより得ることができる。彼らの応答は非常に速く、プラスミドベクターも長く待つことなく簡単に入手できる。

最後に当研究室で作製した組換えアデノウイルスの一覧を表1に示す。

文 献

- 1) Leon RP, Hedlund T, Meech SJ, Li S, Schaack J, Hunger SP, Duke RC and DeGregori J: Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA **95**, 13159-13164 (1998)
- 2) Morsy MA and Caskey CT: Expanded-capacity adenoviral vectors - the helper-dependent vectors. Mol Med Today **5**, 18-24 (1999)
- 3) 東野史裕, 安田元昭, 進藤正信: アデノウイルスと細胞のクロストーク. 蛋白質 核酸 酵素 **45**, 1350-1357 (2000)

- 4) Benihoud K, Yeh P and Perricaudet M: Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 440-447 (1999)
- 5) 鐘ヶ江裕美, 中井通雄, 斎藤 泉: アデノウイルスベクターの改良と応用. *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 549-558 (2000)
- 6) He TC, Zhou S, Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2509-2514 (1998)
- 7) Bett AJ, Haddara W, Prevec L and Graham F: An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertion or deletion in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8802-8806 (1994)
- 8) Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C and Saito I: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1320-1324 (1996)
- 9) Chartier C, Degryse M, Gantzer M, Dieterie A, Pavirani A and Mehtali M: Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* **70**, 4805-4810 (1996)
- 10) Crouzet J, Naudin L, Orsini C, Vigne E, Ferrero L, Roux AL, Benoit P, Latta M, Torrent C, Branellec D et al: Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1414-1419 (1997)
- 11) Mizuguchi H and Kay MA: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation. *Hum Gene Ther* **9**, 2577-2583 (1998)
- 12) Mizuguchi H and Kay MA: A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **10**, 2013-2017 (1999)
- 13) Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y and Phipps ML: Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* **71**, 1842-1849 (1997)
- 14) Yoshida Y and Hamada H: Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 426-430 (1997)
- 15) Wang Y and Huang S: Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *Drug Discovery Today* **5**, 10-16 (2000)
- 16) 植月太一, 岡戸晴生, 鐘ヶ江裕美, 斎藤 泉, 吉川和明: アデノウイルスベクター系 神経生物学のための遺伝子導入発現研究法, 吉川和明編, pp60-81, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 (1997)

Abstract – Simplified method for gene transfer and expression by recombinant adenoviruses. Yoshiko MARUYAMA, Taku NAGAO and Hitoshi KUROSE (Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **116**, 359~370 (2000)

Recombinant adenoviruses are attracting a great deal of attention as a highly efficient gene delivery technology and used for in vitro and in vivo gene expression in science. However, among traditional methods, there have been many difficulties and no simple procedure to generate recombinant adenoviruses. Since almost of all these methods involve the process of homologous recombination in a mammalian packaging cell line, the problems are low efficiency of homologous recombination, the need for complicated techniques and the demand for a long time to generate recombinant viruses. These problems have prevented widespread use of adenovirus technology as effective gene transfer tools. In the last few years, there have been several significant and innovative advances in adenoviral technologies, which include a new generation of vectors, the ease of vector manipulation and improvement of the viral production system with homologous recombination in *E. coli*. Here, we describe the easier and more efficient viral production systems and provide a practical manual for generating recombinant adenoviruses based on one of such systems.

Keywords: recombinant adenovirus; gene transfer

著者プロフィール（実験技術：アデノウイルスを用いた簡便な遺伝子導入発現法）

丸山 芳子（まるやま よしこ）（右端が本人）

東京大学大学院薬学系研究科薬効安全性学教室，大学院生
東京大学薬学部卒業（'99）。

研究テーマ：循環器薬理学，心肥大のメカニズム解明。

趣味：読書，華道。

長尾 拓（ながお たく）（写真左から2人目）

黒瀬 等（くろせ ひとし）（写真左端）

本誌 103 巻 6 号 323 頁（1994）をご参照下さい。