

# 1. 巨大ウイルスの細胞侵入・増殖機構

武村 政春

東京理科大学 理学部第一部 教養学科 生物学教室

ミミウイルスは、その粒子径やゲノムサイズが巨大なだけでなく、複数の翻訳関連遺伝子が発見されたこと、細菌がもつファージ耐性機構である CRISPER Cas システムと同様のシステムをヴァイロファージ耐性機構として保有することで注目された。ミミウイルスは、ファゴサイトーシスによりアカントアメーバ細胞内に侵入すると、スターゲート構造を開け、ゲノム DNA をアカントアメーバ細胞質中に放出し、巨大なウイルス工場を形成する。ウイルス工場ではミミウイルス DNA が複製され、その周辺部に集積したカプシドタンパク質、小胞体由来の脂質二重膜成分をウイルス粒子として取り込みながら、大量に増殖する。マルセイユウイルスは巨大ウイルスの中では小型で、ファゴサイトーシスあるいはエンドサイトーシスによってアカントアメーバ細胞内に入ると、ミミウイルスよりも大きなウイルス工場をアカントアメーバ細胞質に形成し、大量に増殖する。飛びぬけて大きな粒子径、ゲノムサイズを持つパンドラウイルスは、ファゴサイトーシスによりアカントアメーバ細胞内に侵入し、ゲノム DNA を開口部を通じてアカントアメーバ細胞質中に放出する。そして細胞核を壊し、核膜成分を自身の脂質二重膜として取り込みながら、細胞核の“跡地”周辺で増殖する。

## 1. はじめに

2003年、フランスの La Scola らは、それまでにない大きな DNA ウイルスの発見に関するわずか1ページの論文を、『Science』誌上で発表した<sup>1)</sup>。病院の冷却塔の水の中から発見されたこのウイルスは、アカントアメーバ (*Acanthamoeba polyphaga*) に感染する“微生物”としてすでに1992年には見出されていたが、そのあまりの大きさ(光学顕微鏡で確認できる)にウイルスとはみなされず、かつグラム染色陽性を示したことから、グラム陽性細菌の一種として、発見された都市にちなんで“ブラッドフォード球菌”と名付けられていたものであった。rRNA 遺伝子が見出されないこと、暗黒期の存在、そして電子顕微鏡による形態解析などの結果、粒子サイズが400 nm 以上にも

達する巨大なウイルスであると結論付けられた。翌年にはフランスの Raoult らによって全ゲノムが解読され、ウイルスとしては初めてゲノムサイズが1 Mb を超え(1,181,404塩基対)、ORF 数も1262個と、それまでのウイルスで最大となった<sup>2)</sup>。このウイルスは、細菌と極めて類似している(mimicry)という意味を込めて「ミミウイルス (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus* : APMV)」と命名された。

APMV が特に注目を集めたのは、その粒子サイズやゲノムサイズが巨大であっただけではなく、全ゲノム解読の結果、APMV ゲノムは複数の翻訳関連遺伝子が発見されたことであろう<sup>2)</sup>。tRNA 遺伝子ならびに翻訳伸長因子(EF-3)を保有するウイルスは、これまでも報告されていた。1980年代初頭に分離されていた「クロレラウイルス (*Chlorella virus*)」である<sup>3-5)</sup>。現在の巨大ウイルスの概念を確立した“中興の祖”が APMV なら、300 kb 以上のゲノムサイズを持ち、複雑な構造をもつクロレラウイルスは、巨大ウイルス概念の“創業者”であるとも言えよう。ところが APMV には、tRNA や EF-3 遺伝子のみならず、クロレラウイルスでさえ保有していなかった、アミノ酸を tRNA に結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子が4種類発見され、他にも翻訳開始因子など複数の翻訳関連遺伝子が、その長大なゲノムにコードされていることが明

## 連絡先

〒162-8601

東京都新宿区神楽坂1-3

東京理科大学理学部第一部教養学科生物学教室・武村研究室

TEL/FAX: 03-5228-8373

E-mail: takemura@rs.kagu.tus.ac.jp

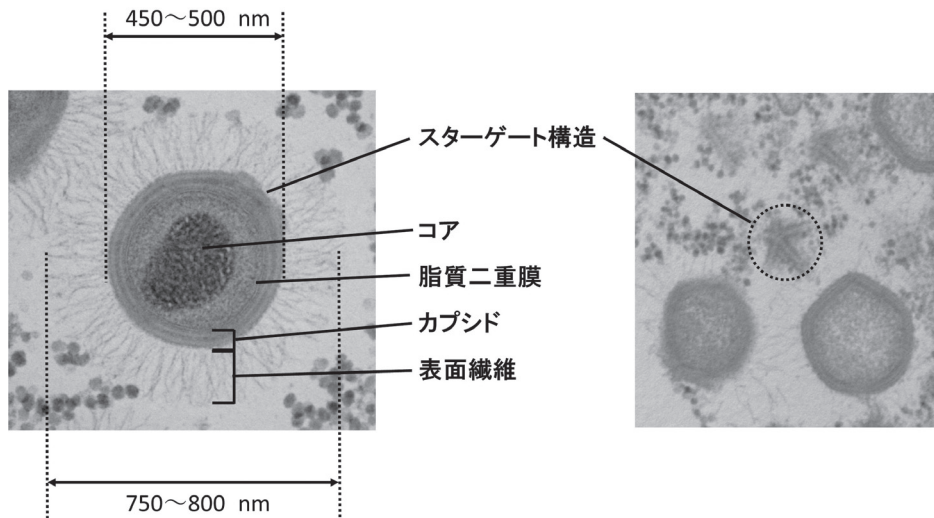


図1 APMVの構造

写真の APMV は La Scola 博士より供与されたもの。筆者がアカントアメーバ (*Acanthamoeba castellanii*) を用いて増殖させ、TEM 写真を撮影した。右の写真は、TEM 解析用のある超薄切片において、偶然スターゲート構造の部分が正面から見えたもの。

らかとなった。その後、APMV の仲間は数多く分離され、「ミミウイルス科 (*Mimiviridae*)」として分類された。2016 年には、ミミウイルス科のウイルスは、細菌がもつファージ耐性機構である CRISPER Cas システムと同様のシステムを、「巨大ウイルスに感染」するヴァイロファージに対する防御機構として保有していることが明らかとなった<sup>6)</sup>。

あたかも細菌であるがごとく複雑な防御機構を持ち、複雑な遺伝子組成を有するゲノムを持つミミウイルスとは、そして巨大ウイルスとはどのようなウイルスなのか。本稿では、ミミウイルスを中心に、これまで報告されている巨大ウイルスの細胞侵入・増殖機構の全体像を概観してみたい。なお、2003 年に分離されたミミウイルスは APMV と表記し、「ミミウイルス科 (*Mimiviridae*)」全般を指す場合には「ミミウイルス」と表記することとする。また、前出のクロレラウイルスは「フィコドナウイルス科 (*Phycodnaviridae*)」に属し、「イリドウイルス科 (*Iridoviridae*)」、「ボックスウイルス科 (*Poxviridae*)」、「アフリカ豚熱病ウイルス科 (*Asfarviridae*)」、「アスコウイルス科 (*Ascoviridae*)」などと共に「核細胞質性大型 DNA ウイルス (nucleocytoplasmic large DNA virus : NCLDV)」という大きなグループを形成しており<sup>7)</sup>、ミミウイルスなどもこれに含まれるため、広義にとらえると「巨大ウイルス = NCLDV」であるとも言える。しかし本稿では、APMV 以降 21 世紀になって新たに分離されてきた、主にアカントアメーバを宿主とする NCLDV を「巨大ウイルス」とし、その細胞侵入・増殖機構について述べることにする。

## 2. ミミウイルスの分類

巨大ウイルスの嚆矢となった APMV はこれまで多くの研究が成され、その近縁種についても世界中から報告されてきた。2008 年、後述するヴァイロファージと共にアカントアメーバに共感染する「ママウイルス (*Acanthamoeba castellanii mamavirus*)」が分離され<sup>8)</sup>、2010 年には、海洋動物プランクトンの一種カフエテリア・レンベルゲンシスに感染する「カフエテリア・レンベルゲンシスウイルス (*CroV*)」が分離された<sup>9)</sup>。2011 年には、APMV を上回るゲノムサイズ (1,259,197 塩基対) を持つ「メガウイルス (*Megavirus chilensis*)」が、チリ沿岸の海水中から分離され<sup>10)</sup>、2012 年には「ムームーウイルス (*Acanthamoeba polyphaga moomouvirus*)」が分離された<sup>11)</sup>。分子系統学的解析により、これらミミウイルスは、アカントアメーバに感染するものがグループ I、*CroV* のようにそれ以外の真核微生物に感染するものがグループ II として分類され、さらにグループ I のアカントアメーバ感染性ミミウイルスは、APMV に近いグループ、ムームーウイルスに近いグループ、そしてメガウイルスに近いグループの 3 つに分類され、それぞれミミウイルス A 系統、ミミウイルス B 系統、ミミウイルス C 系統とされた<sup>12-14)</sup>。

これらの系統のうち、特に A 系統のミミウイルスがこれまで多く分離されており、欧州以外からも、ブラジルのアマゾン・ネグロ河から「サンバウイルス (*Samba virus*)」、アマゾンアウイルス (*Amazonia virus*)、ペロオリゾンテ市の池から「ニーマイヤーウイルス (*Niemeyer virus*)」、ブラジル各地から採取されたカキから新規ミミ

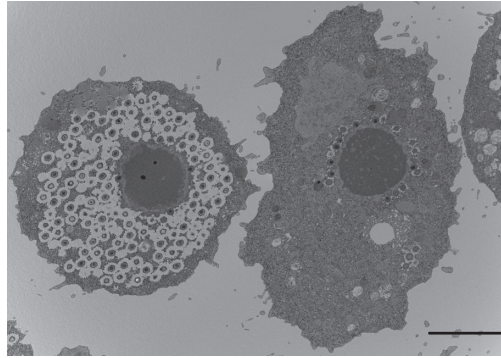


図2 ミミウイルスが感染したアカントアメーバの TEM 写真

*Mimivirus shirakomae* が感染したアカントアメーバを示す。2つの細胞に共通して存在する円形の構造物がウイルス工場である。左の細胞は成熟したミミウイルス粒子で細胞質が満たされている。右の細胞は、今まさに成熟ミミウイルス粒子を放出し始めたウイルス工場であり、その左上には、歪な形をしたアカントアメーバ細胞核が見える。Scale bar は4  $\mu\text{m}$  を表す。

ウイルスがそれぞれ分離され、またインド・ムンバイの下水からアジア初となるミミウイルス (*Mimivirus bombay*) が分離された<sup>15-19)</sup>。さらに今年、筆者らは、長野県白駒池、葛西臨海公園から日本で初めてとなるミミウイルスの分離 (*Mimivirus shirakomae*, *Mimivirus kasaii*) に成功した<sup>20)</sup>。

ミミウイルスは、アカントアメーバなどの単細胞真核微生物以外にも、「シャンウイルス (*Shan virus*)」や「ヒルドウイルス (*Hirudovirus*)」などのように、ヒトやヒルなどの多細胞生物からも分離されている<sup>21-23)</sup>。これらのウイルスがヒトやヒルを自然宿主としているかどうかは定かではないが、ミミウイルスの存在環境の多様性を示唆している例といえよう。2016年現在、ミミウイルス科に属するウイルスの isolate の数はじつに90以上にも上る<sup>24)</sup>。

### 3. ミミウイルスの構造と細胞侵入機構

ミミウイルスの最外層には、表面繊維と呼ばれる、詳細は明らかではないが糖タンパク質を主成分とすると考えられる繊維状構造が存在する。これが、三層にもわたって存在するカプシドの外側を覆っている。正確に言うと、一層のカプシドの外側に、表面繊維の“ベースキャンプ”となるタンパク質の層が存在し、カプシドの内側には、それを裏打ちするようなタンパク質の層が存在する<sup>25)</sup>。この三層のカプシドの内側には脂質二重膜が存在し、その内側にゲノム DNA を含む「コア」がある。コアには、ゲノム DNA と、そこに結合する各種ヌクレオタンパク質が存在し、大きな複合体を形成していると考えられている。ミミウイルスの最外層に存在する表面繊維の層は150 nm もの厚さがあるため、最も外側のカプシドまでの粒子径が450 nm 程度であるミミウイルスは、表面繊維の厚さを含めると750 nm 以上もの大きさをもつことになる (図1)。

ブラジルの Rodrigues らは、ミミウイルスの表面繊維を、ライソザイムや各種タンパク質分解酵素によって処理し、

そのウイルスのアカントアメーバへの感染能を、正常なミミウイルスと比較する実験を行ったところ、処理ミミウイルスのアカントアメーバに対するウイルス価が有意に減少することを見出し、さらに各種単糖との競合阻害実験により、アカントアメーバ細胞膜上に存在するマンノースならびに *N*-アセチルグルコサミン分子が、ミミウイルスのアカントアメーバ細胞膜への吸着に重要であることを明らかにした<sup>26)</sup>。そうしてアカントアメーバ細胞膜に吸着したミミウイルスは、アカントアメーバ自身が引き起こすファゴサイトーシスによって細胞内へと取り込まれ、ファゴソームに包まれた状態となる (図3も参照のこと)<sup>26-29)</sup>。そのままでは、やがてファゴソーム周囲のリソソームがファゴソームと融合し、ミミウイルス粒子が分解されてしまうが、ミミウイルスはそうなる前に次の行動に出る。

ミミウイルスの構造の中で最も特異なものが、正二十面体のカプシドの、ある頂点を起点として自在に開閉が可能な「スターゲート構造」である (図1)<sup>27)</sup>。その名の通り、電子顕微鏡解析によりあたかも「星形」に見える芸術的な構造で、ミミウイルスはこの“門”を開くことで、ゲノム DNA をアカントアメーバ細胞質中に放出する。ファゴソーム内に取り込まれたミミウイルスは、まずスターゲート構造を半開きにして、中に納まっていた脂質二重膜を押し出し、ファゴソーム膜と融合させる。その後、スターゲート構造を完全に開け、中のゲノム DNA を、おそらく結合していたヌクレオタンパク質と共に、コアごとアカントアメーバ細胞質中に放出する<sup>27,30)</sup>。

### 4. ミミウイルスの増殖機構

#### ～巨大なウイルス粒子生産工場の形成～

ミミウイルスは、アカントアメーバ細胞に侵入して3時間もすると、アカントアメーバ細胞質に「virion factory (あるいは viral factory, virus factory: ウイルス粒子生産工

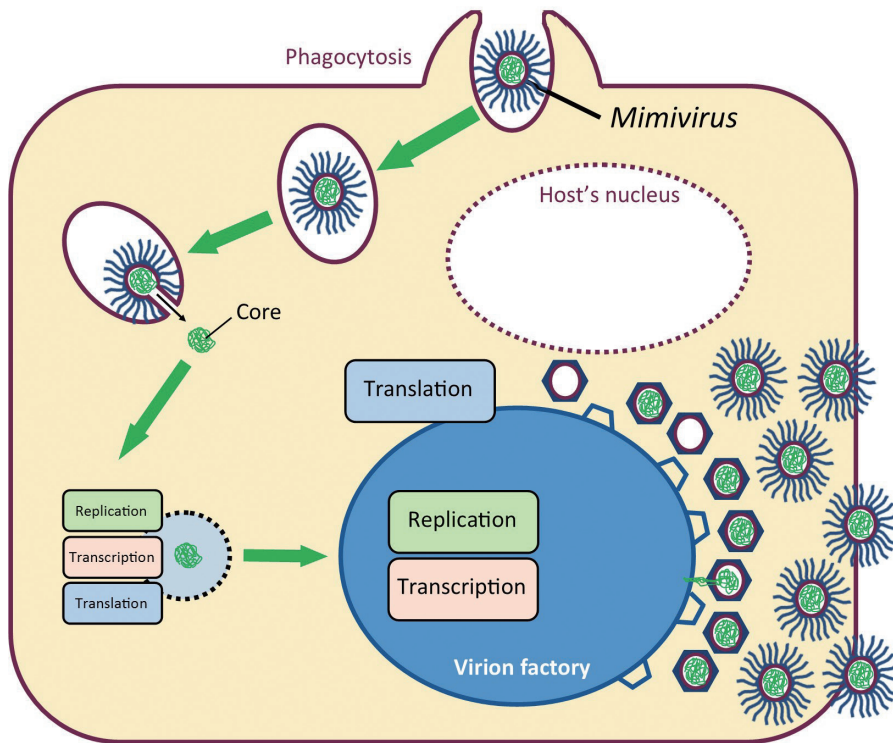


図3 ミミウイルスの細胞侵入・増殖機構

ファゴサイトーシスにより細胞内に取り込まれたミミウイルスは、スターゲート構造を通してコアをアカントアメーバ細胞質中に放出する。放出されたコアは複製、転写、翻訳を開始し、その周囲にウイルス工場を形成する。細胞核と同程度にまで大きくなったウイルス工場からは、ミミウイルス粒子が盛んに生産される。

場)」（以降、「ウイルス工場」と呼ばれる巨大な構造体を構築する<sup>28, 30-34</sup>。侵入2時間後から概ね8時間後あまりまでの間に、ウイルス工場の大きさはアカントアメーバ細胞核と同程度の大きさにまで成長し、侵入後24時間後あたりまで、ウイルス粒子を生産し続ける(図2)。

スターゲート構造を通してアカントアメーバ細胞質中に放出されたミミウイルスコアは、おそらく即座に、その内部に存在するゲノムDNAの複製を、自身のDNAポリメラーゼを用いて開始すると考えられる。最初はコアの内部に存在していたゲノムDNAは、複製によってコア内に納まりきらなくなり、コアを破ってアカントアメーバ細胞質中に展開される<sup>32</sup>。この時、アカントアメーバ細胞質中の粗面小胞体が、複製されつつあるミミウイルスDNAの周囲を、あたかも細胞核が核膜で包まれるがごとくに包み込む過程が観察されている<sup>32</sup>。このような現象は、「ポックスウイルス(Poxvirus)」の一種「ワクシニアウイルス(Vaccinia virus)」の感染過程でも生じることが知られている<sup>35-37</sup>。こうしてミミウイルスのウイルス工場が形成されるが、粗面小胞体は常に周囲を核膜のように途切れなく取り囲んでいるわけではなく、やがてウイルス工場の発達と共に粗面小胞体膜の断片としてウイルス工場周囲に配

置され、これから生じる成熟ミミウイルス粒子の脂質二重膜の素材となる<sup>32</sup>。

ウイルス工場は、大量に複製された(あるいは複製されている)ミミウイルスDNAを含むため、DNA染色試薬で染色すると、ウイルス工場全体が極めて高感度に染色される。最近の研究により、ウイルス工場は高度にダイナミックであり、DNA以外にも多数のウイルス由来タンパク質を含み、そのプロファイルは細胞への侵入後、時間を追うごとに変化していくことが明らかとなった<sup>38</sup>。イスラエルのFridmann-Sirkisらの研究によれば、ウイルス工場における成熟ミミウイルス粒子の生産は、侵入後およそ7時間後あたりから始まるが、それ以前のウイルス工場でのみ見られるタンパク質、7時間後以降でのみ見られるタンパク質、両方の時期で等しくみられるタンパク質など、種類ごとに異なる発現プロファイルを持つらしい<sup>38</sup>。それぞれの具体的な生物学的意義については不明だが、ウイルス工場の成立ならびにウイルス粒子成熟機構の解明には大きな前進であろう。

ウイルス粒子の成熟は、ウイルス工場の辺縁部で起こる(図3)。それはまずカプシドタンパク質の組み立てと、その内部への脂質二重膜の取り込みから始まる<sup>32</sup>。その後、

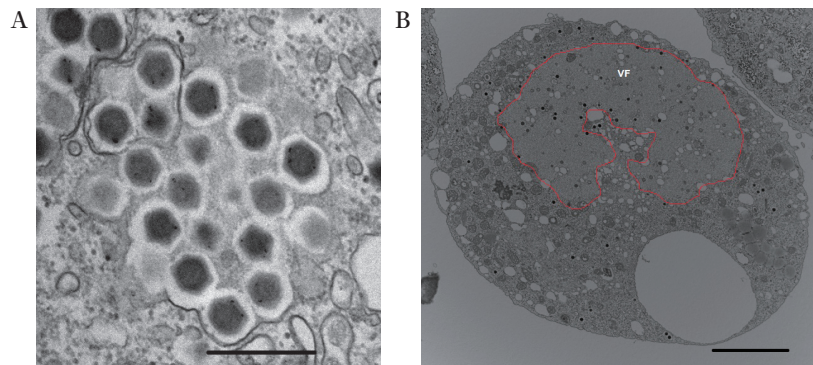


図4 トーキョーウイルスのTEM写真

(A) アカントアメーバ細胞中の成熟したトーキョーウイルス粒子. Scale bar は 500 nm を表す.

(B) アカントアメーバ細胞中のトーキョーウイルスのウイルス工場 (赤く囲んだ部分). Scale bar は 4  $\mu$ m を表す.

まるでストローで吸い込むかのように、ウイルス工場内に存在するゲノム DNA が、組み立てられたカプシド内部に吸い上げられると考えられているが、その機構ならびに“ストロー”の成分は解明されていない<sup>32)</sup>。最後にカプシド表面に表面繊維が構築されて、ミミウイルス粒子は成熟し、アカントアメーバ細胞表面から外界へと放出され、宿主としてミミウイルス粒子の生産に寄与したアカントアメーバ細胞自身は死に、溶解する (図3)。

### 5. ミミウイルスのヴァイロファージ耐性機構

ミミウイルスの複雑性を示す性質の一つが、「ヴァイロファージ」による共感染が見られることである。最初に報告されたのが「スプートニク (Sputnik)」と命名されたヴァイロファージで、マムウイルスに付随してアカントアメーバに共感染することが2009年に報告された<sup>8, 39)</sup>。2014年には、やはりミミウイルスと共感染するヴァイロファージ「ザミロン (Zamilon)」が発見された<sup>40)</sup>。興味深いことに、スプートニクはミミウイルスのA, B, Cいずれの系統に対しても共感染するが、ザミロンはA系統とは共感染せず、B, Cのみと共感染する<sup>8, 40, 41)</sup>。これらヴァイロファージは、ミミウイルスと共にアカントアメーバに侵入すると、ミミウイルスのウイルス工場内に入り込み、そこで増殖する。そのためヴァイロファージに感染されたウイルス工場では、本来のミミウイルス粒子の成熟過程が阻害され、時に異常な粒子形成が起こる<sup>8, 40)</sup>。ヴァイロファージは単独ではアカントアメーバに侵入し、増殖することができず、巨大ウイルスと行動を共にする必要がある。こうした特徴のため、「ウイルスに感染するウイルス」とも呼ばれるのである。

フランスの Levasseur らは2016年、ミミウイルスにこうしたヴァイロファージの共感染に対抗できる防御機構があることを発見した<sup>6)</sup>。ザミロンがA系統ミミウイルスには感染しないというデータに着目し、ゲノムを詳細に検討

したところ、A系統ミミウイルスにザミロン耐性機構が存在することを見出した。その機構 (に關与するミミウイルスゲノム中の塩基配列) は、バクテリアやアーキアが広く持ち、ゲノム編集技術の基礎でもある CRISPER Cas システムと相同なものであると考えられ、MIMIVIRE (mimivirus virophage resistant element) と名付けられた<sup>6)</sup>。A系統ミミウイルスゲノムへのザミロンゲノムの一部塩基配列の挿入と、さらにその一部である15塩基という短い配列のコピーの近傍3か所への挿入が見出されており、その下流には Cas3 と相同な役割を持つと考えられるヘリカーゼならびにエンドヌクレアーゼの遺伝子が存在することが明らかとなった<sup>6)</sup>。

### 6. マルセイユウイルスの細胞侵入・増殖機構

マルセイユウイルス科 (*Marseilleviridae*) に属するウイルス (以降、単に「マルセイユウイルス」) は、巨大ウイルスの中でも最も小さな部類に入る<sup>24, 42, 43)</sup>。2009年、パリで分離された「マルセイユウイルス (*Marseillevirus*)」を founder として、「ローザンヌウイルス (*Lausannevirus*)」、 「チュニスウイルス (*Tunisvirus*)」、 「メルボルンウイルス (*Melbournevirus*)」など、現在までに三十数種類の isolate が、欧州、オーストラリア、アフリカ、ブラジルなど世界各地から、そして時には昆虫や、ヒトの腸内細菌叢から分離されている<sup>44-51)</sup>。筆者は2016年、東京・荒川の河川敷の水サンプルから、これまでのマルセイユウイルスとは若干系統を異にすると考えられる「トーキョーウイルス (*Tokyovirus*)」を分離した<sup>52, 53)</sup>。これらマルセイユウイルスは、いずれもアカントアメーバを自然宿主としていると考えられている。ミミウイルスと同様に、マルセイユウイルスにもいくつかの系統があり、マルセイユウイルス・メルボルンウイルス・「カンヌウイルス (*Cannes 8 virus*)」はA系統、ローザンヌウイルス・「ポートミオウイルス (*Port-Miou virus*)」はB系統、「インセクトマイムウイル

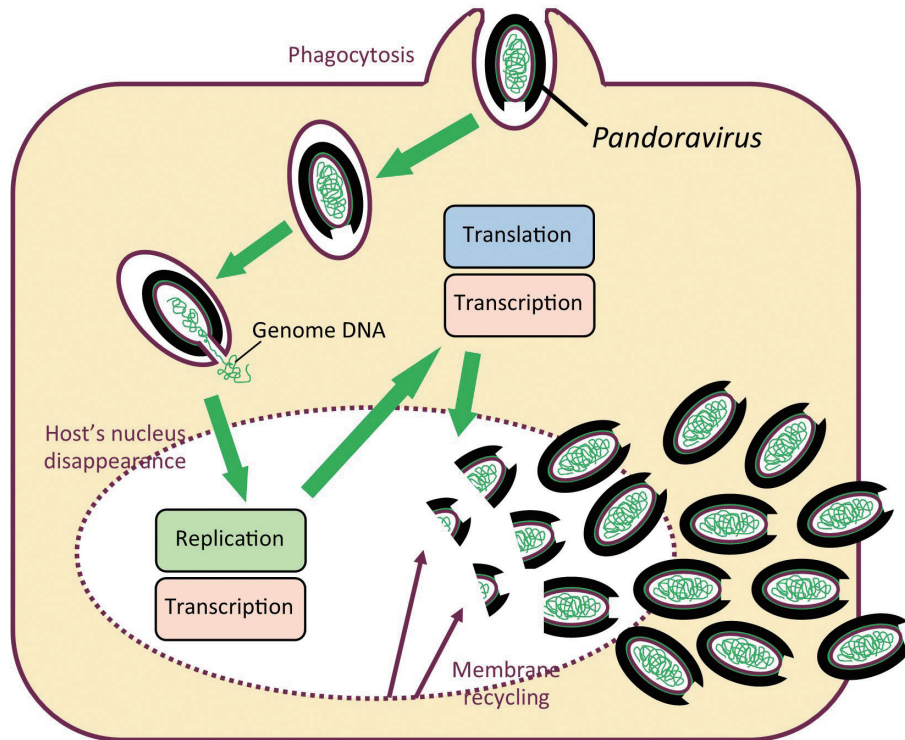


図5 パンドラウイルスの細胞侵入・増殖機構

ファゴサイトーシスにより細胞内に取り込まれたパンドラウイルスは、その開口部を通して、内部の脂質二重膜をファゴソーム膜と融合させ、ゲノムをアカントアメーバ細胞質中に放出する。放出されたゲノム DNA は細胞核へと移行し、そこで複製、転写を開始する。この時、核膜は消失し、細胞核の形は見えなくなる。パンドラウイルス mRNA は細胞質にあるリボソームを用いてタンパク質を合成し、やがて細胞核の「跡地」において、核膜を自身の脂質二重膜として「リサイクル」し、大量のパンドラウイルス粒子を生産する。

ス (*Insectomime virus*)・チュニスウイルスは C 系統、「ブラジルマルセイユウイルス (*Brazilian marseillevirus*)」は D 系統、そしてトーキョーウイルスは E 系統である<sup>43, 46, 50, 51, 53</sup>。

マルセイユウイルスは、粒子径が 200 nm 前後の正二十面体を呈したウイルスであり、ミミウイルスのような表面繊維は存在しない (図 4A)。そのため比較的容易に結晶化されると考えられる。ゲノムサイズは 300 ~ 400 kb 程度であり、粒子径と共に、最も小さな巨大ウイルスというよりも、最も大きな (巨大ウイルスでない) ウイルス、というイメージの方が当てはまるが、分子系統学的解析から、マルセイユウイルスも巨大ウイルスの一員として位置付けられる<sup>24, 42</sup>。カプシドの内部には脂質二重膜があり、その内側にゲノム DNA があるが<sup>42, 43</sup>、詳細な構造解析はそれほど進んでいない。

マルセイユウイルスのアカントアメーバへの侵入機構はこれまでよくわかっていなかったが、2016 年、ブラジルの Arantes らにより初めてそのモデルが提唱された<sup>54</sup>。マルセイユウイルスは、一個の粒子が侵入する場合にはアカントアメーバ細胞によるエンドサイトーシスにより細胞

内エンドソームに入るが、時には複数の粒子が集団で侵入する場合もあり、その場合はミミウイルスなどの巨大ウイルスがそうであるように、ファゴサイトーシスにより細胞内ファゴソームに入る<sup>54</sup>。このマルセイユウイルス集団は、時には細胞膜と同様の膜で包まれた「vesicle」状構造を呈しており<sup>54</sup>、マルセイユウイルスの増殖により死んだアカントアメーバ細胞から放出されたものが、その状態で再び別のアカントアメーバ細胞に感染するのではないかと考えられる。

アカントアメーバ細胞内に侵入したマルセイユウイルスは、エンドソームもしくはファゴソームから脱出し (その機構は不明)、細胞質でウイルス工場を形成する。マルセイユウイルスのウイルス工場は、時にはミミウイルスよりも巨大となり、アカントアメーバ細胞質の三分の一を占めるまでになる (図 4B)<sup>42, 53, 54</sup>。ミミウイルスと同様に、ウイルス工場においてゲノム DNA が盛んに複製されるが、ミミウイルスのようにウイルス工場の周辺部から成熟粒子が形成されて放出される方法とは異なり、ウイルス工場内において、カプシド、脂質二重膜、ゲノム DNA の形成が同時進行的に (simultaneously) 起こり、ウイルス粒

子が成熟すると考えられている<sup>42, 53, 54)</sup>。

## 7. パンドラウイルス、ピソウイルスの 細胞侵入・増殖機構

2013年、フランスのPhilippeらは、オーストラリア・メルボルン近郊の沼地の底と、チリのトゥンケン川の河口の土それぞれから、ミミウイルスよりもさらに大きな粒子径をもつ巨大ウイルスを分離することに成功し、「パンドラウイルス (*Pandoravirus dulcis* ならびに *Pandoravirus salinus*)」と名づけた<sup>55)</sup>。パンドラウイルスは、ミミウイルスやマルセイユウイルスのような正二十面体構造は呈しておらず、楕円形の壺のような構造をもち、長径はゆうに1 $\mu$ mにも達する。その一端には、ゲノムDNAをアメーバ細胞質に放出するための開口部がある。パンドラウイルスのうち *Pandoravirus salinus* のゲノムサイズは、それまでのウイルスで最大となる2.7 Mbであり、最小の真核生物よりも大きいゲノムサイズをもつ、史上初のウイルスとなった<sup>55)</sup>。また、その形態的特徴から、2008年に角膜炎を起こした患者から分離されていた、アcantアメーバに寄生する寄生体がパンドラウイルスの一種であることも明らかとなり、2015年にはそのゲノムが解読され、*Pandoravirus inopinatum* と名付けられた<sup>56, 57)</sup>。ゲノムサイズに関しては、*Pandoravirus salinus* が2.7 Mbと最も大きく、*Pandoravirus dulcis* は1.9 Mb、*Pandoravirus inopinatum* は2.2 Mbと、それぞれの種で大きく異なるのが特徴である<sup>34)</sup>。

パンドラウイルスのアcantアメーバへの侵入は、アメーバによるファゴサイトーシスにより開始される(図5)。ファゴソームの中に取り込まれたパンドラウイルスは、その粒子開口部を通じて内部の脂質二重膜をファゴソーム膜に融合させた後、ゲノムを含むコアをアcantアメーバ細胞質へと放出する<sup>34, 55)</sup>。コアはアcantアメーバの細胞核近辺へと移動し、そこで複製、初期転写を始めるが、そのころにはアcantアメーバの細胞核はその形を失い、核膜は分散して見えなくなる。分散した核膜の成分は、新しいパンドラウイルス粒子の脂質二重膜の材料となり、侵入後8~10時間後には、かつて細胞核が存在した領域から新たなパンドラウイルス粒子が形成される(図5)。ウイルス粒子の形成は、通常のウイルス粒子のような“packaging”とは異なり、開口部から反対側の末端にかけて、マルセイユウイルスと同様に、あたかもスキャンするかのようにかプシドや内部のコアの形成が同時進行的に起こると考えられている(図5)<sup>55)</sup>。侵入後15~18時間後にはアcantアメーバは溶解し、細胞1個あたり1000個あまりのパンドラウイルス粒子が放出される<sup>34, 55)</sup>。

2014年、およそ3万年前のものとするシベリアの永久凍土の中から、シスト(芽胞)状態となったアcantアメーバに感染した巨大ウイルス「ピソウイルス (*Pithovirus sibericum*)」が発見された<sup>58)</sup>。パンドラウイルスと同様

の壺型構造を呈しており、その長径はパンドラウイルスよりもさらに長い1.5 $\mu$ mほどもあったが、短径はパンドラウイルスよりもやや短く、全体としてはパンドラウイルスよりもやや細長い形状を呈し、その開口部には、メッシュ状の“コルク栓”のような構造が存在する。興味深いことに、ピソウイルス粒子の形態的特徴は極めてパンドラウイルスに似ているが、ゲノムはパンドラウイルスよりもマルセイユウイルスなどの正二十面体ウイルスに近く、ゲノムサイズは610 kb程度である<sup>34, 58)</sup>。*Pandoravirus inopinatum*と同様に、すでに2003年に報告されていた奇妙な寄生体KC5/2が、じつはピソウイルスであることが判明したという例が知られる<sup>59, 60)</sup>。

ピソウイルスのアcantアメーバへの侵入もまたファゴサイトーシスにより開始される。ファゴソームに取り込まれたピソウイルスは、まず開口部の“コルク栓”が消失し、内部の脂質二重膜がファゴソーム膜と融合し、ゲノムがアcantアメーバ細胞質へと放出される。興味深いことに、ピソウイルスはパンドラウイルスのように宿主の細胞核を消失させたりはせず、アcantアメーバ細胞核はそのままに、細胞質で増殖する。ミミウイルスほど明瞭ではないが、一定の領域からなるウイルス工場を形成し、ウイルス粒子が形成される。侵入後15時間には、細胞1個あたり数千個ものピソウイルス粒子が放出される<sup>34, 58)</sup>。

## 8. おわりに

ピソウイルス以降、さらに異なる特徴を持つ“壺型ウイルス”である「モリウイルス (*Mollivirus sibericum*)」、アフリカ豚熱病ウイルス (*Asfarvirus*) に似た正二十面体ウイルスである「ファウストウイルス (*Faustovirus*)」が発見され、巨大ウイルスの世界はさらに広がった<sup>61, 62)</sup>。こうしている間にも、リアルタイムで続々と新しい巨大ウイルスが、様々な研究グループによって見出されている。

巨大ウイルスの分子系統学的研究は、ミミウイルス、パンドラウイルス、マルセイユウイルスなど、形態的特徴や増殖機構が異なる巨大ウイルスが、起源を遡れば共通の祖先へと行きつく、単系統のグループであることを示してきた<sup>2, 5, 7, 63, 64)</sup>。果たして巨大ウイルスの共通祖先とはどのようなものであって、それがどのような過程を経て、現在のような多様な増殖機構を持つ多様な巨大ウイルスへと進化したのだろうか。

筆者とオーストラリアのBellは2001年、DNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼなどの分子系統学的解析により、ボックスウイルスのような大型DNAウイルスの祖先が、古細菌(正確には真核生物と古細菌の共通祖先である古細菌様原核生物)に感染したことが引き金となり細胞核が形成されたとする仮説を、それぞれ独立に提唱した<sup>65, 66)</sup>。この仮説提唱の2年後、APMVが発見され、巨大ウイルスの特異な世界が徐々に明らかとなり、ミミウイルスが、感

染したアカントアメーバ細胞質に細胞核と同程度の大きさをもつ巨大なウイルス工場を形成することが明らかになると、細胞核とウイルス工場との関係が注目されるようになった。ウイルス工場では巨大ウイルス DNA の活発な複製が行われており、さらにその周囲には小胞体由来の膜成分が寄り集まり、一定の秩序立った構造が形成されている。その様は、ウイルス工場があたかも細胞核であるかのようにふるまっていると見えなくもない<sup>67)</sup>。近年では、フランスの Forterre による「Virocell concept」など、ウイルスと細胞との関係やウイルスそのものの見方を根本的に変えるような新たな考え方も提唱されるようになってきた<sup>67-69)</sup>。

巨大ウイルス研究は、巨大ウイルスの細胞侵入・増殖機構の解明を通じてその世界を明らかにし、これらのウイルスが微生物生態系においてどのような生物学的役割を担っているのかを明らかにすると共に、真核生物の進化に巨大ウイルスがどのように関わってきたかを解き明かすものでもある。さらに巨大ウイルスは、その生物にも迫ろうとする複雑性ゆえに、「生物とは何か」という生物学の根幹をも、揺さぶる存在になりつつある。

今後の研究に期待したい。

#### 謝 辞

本稿執筆の機会を与えていただきました「ウイルス」編集委員長・渡邊雄一郎先生に深く感謝申し上げます。

東京薬科大学・横堀伸一先生ならびに京都大学・緒方博之先生には、分子系統樹解析の一部をご担当いただき、様々な示唆ならびにご指導をいただきました。北海道大学・山口博之先生には、アカントアメーバ培養法につき、丁寧なご指導をいただきました。エクスマルセイユ大学 (仏)・Chantal Abergel 博士には、トーキョーウイルスの分離過程で多くのご助言をいただき、同大・Bernald La Scola 博士には、日本からのミミウイルス株の分離過程で多くのご助言をいただき、また Positive control として APMV をご供与いただきました。以上の皆様に、改めて深く感謝申し上げます。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

#### 参考文献

- 1) La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D: A giant virus in Amoebae. *Science* 299:2033, 2003.
- 2) Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie JM: The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 306:1344-1350, 2004.
- 3) Van Etten JL: Unusual life style of giant chlorella viruses. *Annu. Rev. Genet.* 37:153-195, 2003.
- 4) Yamada T, Onimatsu H, Van Etten JL: Chlorella viruses. *Adv. Virus Res.* 66:293-366, 2006.
- 5) Yamada T: Giant viruses in the environment: their origins and evolution. *Curr. Opin. Virol.* 1:58-62, 2011.
- 6) Levasseur A, Bekliz M, Chabriere E, Pontarotti P, La Scola B, Raoult D: MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage. *Nature* 531:249-252, 2016.
- 7) Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L: Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* 117:156-184, 2006.
- 8) La Scola B, Desnues C, Pagnier I, Robert C, Barrassi L, Fournous G, Merchat M, Suzan-Monti M, Forterre P, Koonin E, Raoult D: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455:100-104, 2008.
- 9) Fischer MG, Allen MJ, Wilson WH, Suttle CA: Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:19508-19513, 2010.
- 10) Arslan D, Legendre M, Seltzer V, Abergel C, Claverie JM: Distant mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:17486-1491, 2011.
- 11) Yoosuf N, Yutin N, Colson P, Shabalina SA, Pagnier I, Robert C, Azza S, Klose T, Wong J, Rossmann MG, La Scola B, Raoult D, Koonin EV: Related giant viruses in distant locations and different habitats: Acanthamoeba polyphaga mouloumou virus represents a third lineage of the Mimiviridae that is close to the Megavirus lineage. *Genome Biol. Evol.* 4:1324-1330, 2012.
- 12) Colson P, de Lamballerie X, Fournous G, Raoult D: Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales. *Intervirology* 55:321-332, 2012.
- 13) Desnues C, La Scola B, Yutin N, Fournous G, Robert C, Azza S, Jardot P, Monteil S, Campocasso A, Koonin EV, Raoult D: Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:18078-18083, 2012.
- 14) Ngounga T, Pagnier I, Reteno DGI, Raoult D, La Scola B, Colson P: Real-time PCR systems targeting giant viruses of Amoebae and their virophages. *Intervirology* 56:413-423, 2013.
- 15) Campos RK, Boratto PV, Assis FL, Aguiar ERGR, Silva LCF, Albarnaz JD, Dornas FP, Trindade GS, Ferreira PP, Marques JT, Robert C, Raoult D, Kroon EG, La Scola B, Abrahao JS: Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virol. J.* 11:95, 2014.
- 16) Assis FL, Bajrai L, Abrahao JS, Kroon EG, Dornas FP, Andrade KR, Boratto PVM, Pilotto MR, Robert C, Benamar S, La Scola B, Colson P: Pan-genome analysis of Brazilian lineage A amoebal mimiviruses. *Viruses* 7:3483-3499, 2015.
- 17) Boratto PVM, Arantes TS, Silva LCF, Assis FL, Kroon EG, La Scola B, Abrahao JS: Niemeyer virus: a new mimivirus group A isolate harboring a set of duplicat-



- ed aminoacyl-tRNA synthetase genes. *Frontiers in Microbiol.* 6:1256, 2015.
- 18) Andrade KR, Boratto PPVM, Rodrigues FP, Silva LCF, Dornas FP, Pilotto MR, La Scola B, Almeida GMF, Kroon EG, Abrahao JS: Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Arch. Virol.* 160:477-482, 2015.
  - 19) Chatterjee A, Ali F, Bange D, Kondabagil K: Isolation and complete genome sequencing of Mimivirus Bombay, a giant virus in sewage of Mumbai, India. *Genomics Data* 9:1-3, 2016.
  - 20) Takemura M, Mikami T, Murono S: Nearly complete genome sequences of two Mimivirus strains isolated from Japanese fresh water pond and river mouth. *Genome Announc.* in press.
  - 21) Saadi H, Reteno DG, Colson P, Aherfi S, Minodier P, Pagnier I, Raoult D, La Scola B: Shan virus: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. *Intervirolog.* 56:424-429, 2013.
  - 22) Saadi H, Pagnier I, Colson P, Cherif JK, Beji M, Boughalmi M, Assa S, Armstrong N, Robert C, Fournous G, La Scola B, Raoult D: First isolation of mimivirus in a patient with pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 57:e127-e134, 2013.
  - 23) Boughalmi M, Pagnier I, Aherfi S, Colson P, Raoult D, La Scola B: First isolation of a giant virus from wild *Hirudo medicinalis* leech: Mimiviridae isolation in *Hirudo medicinalis*. *Viruses* 5:2920-2930, 2013.
  - 24) Aherfi S, Colson P, La Scola B, Raoult D: Giant viruses of amoebas: an update. *Front. Microbiol.* 7:doi:10.3389/fmicb.2016.00349, 2016.
  - 25) Klose T, Kuznetsov YG, Xiao C, Sun S, McPherson A, Rossmann MG: The three-dimensional structure of mimivirus. *Intervirolog.* 53:268-273, 2010.
  - 26) Rodrigues RAL, Silva LKdS, Dornas FP, de Oliveira DB, Magalhaes TFF, Santos DA, Costa AO, Farias LdM, Magalhaes PP, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Cortines JR, Abrahao JS: Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. *J. Virol.* 89:11812-11819, 2015.
  - 27) Zauberman N, Mutsafi Y, Halevy DB, Shimoni E, Klein E, Xiao C, Sun S, Minsky A: Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biol.* 6:e114, 2008.
  - 28) Suzan-Monti M, La Scola B, Barrassi L, Espinosa L, Raoult D: Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS One* 3:e328, 2007.
  - 29) Ghigo E, Kartenbeck J, Lien P, Pelkmans L, Capo C, Mege JL, Raoult D: Amoebal pathogen Mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathogens* 4:e1000087, 2008.
  - 30) Kuznetsov Y, Klose T, Rossmann M, McPherson A: Morphogenesis of Mimivirus and its viral factories: an atomic force microscopy study of infected cells. *J. Virol.* 87:11200-11213, 2013.
  - 31) Claverie JM, Abergel C: Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses. *Trends in Genet.* 26:431-437, 2010.
  - 32) Mutsafi Y, Fridmann-Sirkis Y, Milrot E, Hevroni L, Minsky A: Infection cycles of large DNA viruses: emerging themes and underlying questions. *Virol.* 466-467:3-14, 2014.
  - 33) Ogata H, Takemura M: A decade of giant virus genomics: surprising discoveries opening new questions. *In Global Virology I – Identifying and Investigating Viral Diseases*, Edited by P. Shapshak et al, pp. 147-160, Springer, 2015.
  - 34) Abergel C, Legendre M, Claverie JM: The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiol. Rev.* fuv037, 2015.
  - 35) Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Locker JK: Vaccinia virus DNA-replication occurs in ER-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol. Biol. Cell* 12:2031-2046, 2001.
  - 36) Schramm B, Locker JK: Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication. *Traffic* 6:839-846, 2005.
  - 37) Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C: Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* 97:147-172, 2005.
  - 38) Fridmann-Sirkis Y, Milrot E, Mutsafi Y, Ben-Dor S, Levin Y, Savidor A, Kartvelishvily E, Minsky A: Efficiency in complexity: composition and dynamic nature of Mimivirus replication factories. *J. Virol.* 90:10039-10047, 2016.
  - 39) Claverie JM, Abergel C: Mimivirus and its virophage. *Ann. Rev. Genet.* 43:49-66, 2009.
  - 40) Gaia M, Benamar S, Boughalmi M, Pagnier I, Croce O, Colson P, Raoult D, La Scola B: Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity. *PLoS One* 9: e94923, 2014.
  - 41) Gaia M, Pagnier I, Campocasso A, Fournous G, Raoult D, La Scola B: Broad spectrum of Mimiviridae virophage allows its isolation using a mimivirus reporter. *PLoS One* 8:e61912, 2013.
  - 42) Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, Robert C, Azza S, Sun S, Rossmann MG, Suzan-Monti M, La Scola B, Koonin EV, Raoult D: Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:21848-21853, 2009.
  - 43) Colson P, Pagnier I, Yoosuf N, Fournous G, La Scola B, Raoult D: "Marseilleviridae", a new family of giant viruses infecting amoebae. *Arch. Virol.* 158:915-920, 2013.
  - 44) Thomas V, Bertelli C, Collyn F, Casson N, Telenti A, Goesmann A, Croxatto A, Greub G: Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ. Microbiol.* 13:1454-1466, 2011.
  - 45) Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D: Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:1185-1193, 2012.
  - 46) Aherfi S, Pagnier I, Fournous G, Raoult D, La Scola B,

- Colson P: Complete genome sequence of Cannes 8 virus, a new member of the proposed family "Marseilleviridae." *Virus Genes* 47:550-555, 2013.
- 47) Boughalmi M, Pagnier I, Aherfi S, Colson P, Raoult D, La Scola B: First isolation of a Marseillevirus in the diptera syrphidae *Eristalis tenax*. *Interviol.* 56:386-394, 2013.
- 48) Aherfi S, Boughalmi M, Pagnier I, Fournous G, La Scola B, Raoult D, Colson P: Complete genome sequence of Tunisvirus, a new member of the proposed family *Marseilleviridae*. *Arch. Virol.* 159:2349-2358, 2014.
- 49) Doutre G, Philippe N, Abergel C, Claverie JM: Genome analysis of the first Marseilleviridae representative from Australia indicates that most of its genes contribute to virus fitness. *J. Virol.* 88:14340-14349, 2014.
- 50) Doutre G, Arfib B, Rochette P, Claverie JM, Bonin P, Abergel C: Complete genome sequence of a new member of the Marseilleviridae recovered from the Brackish submarine spring in the Cassis Port-Miou Calanque, France. *Genome Announc.* 3:e01148-15, 2015.
- 51) Dornas FP, Assis FL, Aherfi S, Arantes T, Abrahão JS, Philippe C, La Scola B: A Brazilian Marseillevirus is the founding member of a lineage in family *Marseilleviridae*. *Viruses* 8(76): doi:10.3390/v8030076, 2016.
- 52) Takemura M: The draft genome sequence of *Tokyovirus*, a member of *Marseilleviridae* isolated from the Arakawa River of Tokyo, Japan. *Genome Announc.* 4:e00429-16, 2016.
- 53) Takemura M: Morphological and taxonomic properties of *Tokyovirus*, the first Marseilleviridae member isolated from Japan. *Microbes Environ.* in press.
- 54) Arantes TS, Rodrigues RAL, Silva LKS, Oliveira GP, de Souza HL, Khalil JYB, de Oliveira DB, Torres AA, da Silva LL, Colson P, Kroon EG, de Fonseca FG, Bonjardim CA, La Scola B, Abrahao JS: The large Marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. *J. Virol.* 90:5246-5255, 2016.
- 55) Philippe N, Legendre M, Doutre G, Coute Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C: Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 341:281-286, 2013.
- 56) Scheid P, Zoeller L, Pressmar S, Richard G, Michel R: An extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp. isolated from a patient with keratitis. *Parasitol. Res.* 102:945-950, 2008.
- 57) Antwerpen MH, Georgi E, Zoeller L, Woelfel R, Stoecker K, Scheid P: Whole-genome sequencing of a Pandoravirus isolated from keratitis-inducing *Acanthamoeba*. *Genome Announc.* 3:e00136-15, 2015.
- 58) Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, Lescot M, Poirot O, Bertaux L, Bruley C, Coute Y, Rivkina E, Abergel C, Claverie JM: Thirty-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:4274-4279, 2014.
- 59) Michel R, Müller KD, Schmid EN, Zoeller L, Hoffmann R: Endocytobiont KC5/2 induces sol-like cytoplasm of its host *Acanthamoeba* sp. as substrate for its own development. *Parasitol. Res.* 90:52-56, 2003.
- 60) Michel R, Schmid EN, Hoffmann R, Müller KD: Endoparasite KC5/2 encloses large areas of sol-like cytoplasm within *Acanthamoebae*. Normal behavior or aberration? *Parasitol. Res.* 91:265-266, 2003.
- 61) Legendre M, Lartigue A, Bertaux L, Jeudy S, Bartoli J, Lescot M, Alempic JM, Ramus C, Bruley C, Labadie K, Shmakova L, Rivkina E, Coute Y, Abergel C, Claverie JM: In-depth study of *Mollivirus sibericum*, a new 30,000-y-old giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E5327-5335, 2015.
- 62) Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, Andreani J, Armstrong N, Klose T, Rossmann M, Colson P, Raoult D, La Scola B: Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J. Virol.* 89:6585-6594, 2015.
- 63) Monier A, Claverie JM, Ogata H: Taxonomic distribution of large DNA viruses in the sea. *Genome Biol.* 9:R106, 2008.
- 64) Takemura M, Yokobori S, Ogata H: Evolution of eukaryotic DNA polymerases via interaction between cells and large DNA viruses. *J. Mol. Evol.* 81:24-33, 2015.
- 65) Takemura M: Poxviruses and the origin of the eukaryotic nucleus. *J. Mol. Evol.* 52:419-425, 2001.
- 66) Bell PJJ: Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus? *J. Mol. Evol.* 53:251-256, 2001.
- 67) Forterre P, Gaia M: Giant viruses and the origin of modern eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 31:44-49, 2016.
- 68) Forterre P: Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept. *Interviol.* 53:362-378, 2010.
- 69) Forterre P: Manipulation of cellular syntheses and the nature of viruses: the virocell concept. *C. R. Chimie* 14:392-399, 2011.

# Infection and Proliferation of Giant Viruses in Amoeba Cells

**Masaharu TAKEMURA**

Laboratory of Biology, Department of Liberal Arts, Faculty of Science, Tokyo University of Science

*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, the first discovered giant virus with genome size and particle size much larger than previously discovered viruses, possesses several genes for translation and CRISPER Cas system-like defense mechanism against virophages, which co-infect amoeba cells with the giant virus and which inhibit giant virus proliferation. *Mimiviruses* infect amoeba cells by phagocytosis and release their DNA into amoeba cytoplasm through their stargate structure. After infection, giant virion factories (VFs) form in amoeba cytoplasm, followed by DNA replication and particle formation at peripheral regions of VF. *Marseilleviruses*, the smallest giant viruses, infect amoeba cells by phagocytosis or endocytosis, form larger VF than *Mimivirus's* VF in amoeba cytoplasm, and replicate their particles. *Pandoraviruses* found in 2013 have the largest genome size and particle size among all viruses ever found. *Pandoraviruses* infect amoeba cells by phagocytosis and release their DNA into amoeba cytoplasm through their mouth-like apical pores. The proliferation of *Pandoraviruses* occurs along with nucleus disruption. New virions form at the periphery of the region formerly occupied by the amoeba cell nucleus.

