ARBOR 群ウイルスの化学的性状に関する研究

第3報 部分精製された ARBOR ウイルスに 対する種々の酵素の作用*

竹 原 学**

STUDIES ON SOME CHEMICAL PROPERTIES OF ARBOR VIRUSES

III. EFFECT OF ENZYMES ON PARTIALLY PURIFIED ARBOR VIRUSES

MANABU TAKEHARA

[受稿: 11 月 28 日, 1962]

ウイルス粒子に対する酵素の影響を検討した実験は従来より若干報告されているが^{2, 10-14, 16-18}, それ等の多くは主として蛋白分解酵素に関するものであり, ウイルス材料も精製処理を施さないものが多く使用されているようである. 全く別の目的から蛋白分解酵素に安定なウイルスの部分精製に当該酵素を比較的高濃度で作用させることにより非感染性の不純物を消化し除こうとする試みもある. Arbor ウイルスに対する酵素の影響を検討した実験は数少ないのであるが, 最近 Ada 等(1960, 1961)^{4, 5}, は著者と大体同じ目的より Murray Valley encephalitis virus に対する Phospholipase A の影響を検討し興味ある知見を得ている.

種々の酵素によるウイルスの不活化の機作についてはかなり広範囲な議論がなされているが未だ確定するに至っていない^{9, 15}, また酵素を作用させることにより反ってウイルス感染力の高まるという報告⁸ も若干見られる. 何れにしてもウイルス粒子の化学的構成成分を種々の酵素作用の結果から一応定性的に解析することは, この方面の詳細なる研究に何等かの資料を提供するものと考えられる.

今回著者は既報^{22, 23}のごとく組織培養された日本脳炎(以下 JBE と略す) ウイルス (G 1 株) を ECTEOLA-Cellulose カラムによつて部分的精製を行ない, それ等

の粒子に対する蛋白分解酵素, 脂質分解酵素ならびにその他 2, 3 の酵素の不活性化作用を一定条件の下で観察した. さらに 以上の実験結果を拡張するため Arbor B 群のデング熱ならびに黄熱ウイルスに対するトリプシンもしくはリパーゼの影響を観察した. 是等と比較実験の意味からややウイルス性状の異なると思われるアメリカ西部型ウマ脳炎ウイルス (WEE) およびポリオウイルスを供試して同様の実験を実施した.

実験材料ならびに実験方法

1. 供試ウイルス株:

既報^{22, 23}と同様に日本脳炎 (G 1 株), デング熱 1 型 (望月株), 黄熱 (17 D 株) およびアメリカ西部型ウマ脳炎ウイルス (Rockefeller 研究所保存株) は何れもハムスター腎細胞培養に増殖させた感染培養液相を使用し, ポリオウイルス II 型 (MEF-1 株) は HeLa 細胞に増殖させたものを使用した. 以上の供試ウイルスは何れも EC-TEOLA-Cellulose カラム法もしくは Fluorocarbon 処理法により部分的に精製処理を行なった.

2. 供試酵素標品:

a) トリプシン: 粉末トリプシン (Difco Lab. 製) を 0.25 % の割合に Ca^{2+} , Mg^{2+} を除いた Dulbecco's phosphate buffer saline に溶解し使用した. あるいは結晶性トリプシン (Nutritional Biochemicals Corp. 製, 以下 N. B. C. 製と略す) を同じ濃度に溶解し使用した.

b) パパイン: 粉末パパイン (Merck 製) を使用した.

c) 細菌中性プロティナーゼ: 大阪市立大学理学部福本研究室より分与を受けた結晶性細菌プロティナーゼを

* 本報の要旨は第 6 回日本ウイルス学会西日本支部総会 (1960 年 6 月, 名古屋) 並びに第 8 回同学会総会 (1960 年 10 月, 京都) で発表した.

** 神戸医科大学微生物学教室 (主任: 堀田進教授)

使用した。

d) 腓リパーゼ：粉末腓リパーゼ（東京化成製）を使用した⁷⁾。

e) カビ性リパーゼ：糸状菌の1菌株より分離、精製された液状標品(500 u/ml, その力価1u は pH 5.6, 30°C, 2.5時間の作用条件において2g のオリーブ油を1%分解する)で大阪市大理学部福本研究室より分与されたものである。0.07 M Phosphate buffer 以下PBと略す, pH 5.6)に溶解し, 250 u/ml 溶液を作製した。

f) リゾチーム：結晶性リゾチーム（東京化成製）を使用した。

g) α -アミラーゼ：結晶性 α -アミラーゼ（N.B.C. 製）を使用した。

h) リボヌクレアーゼ：結晶性リボヌクレアーゼ（N.B.C. 製）を使用した。

以上の各種酵素は特に記載のない場合何れも0.25%の割合に0.07 M PB(pH 7.2)に溶解し使用した。

3. JBE ウイルスの pH による安定性：

JBE ウイルスに対する酵素の作用を検討するに先立ち、本ウイルスの種々なる pH 環境における安定性を観察した。部分的に精製されたウイルス液を含む7本の試験管を氷冷しつつ速やかに5%-NaOH もしくは HCl で pH 3.1~9.0 まで調整した後、37°C, 3時間恒温槽中に保ち、型のごとく液中のウイルス活性をマウス脳内接種により測定した¹⁹⁾。

4. ウイルスに対する酵素作用の測定方法：

前項のごとく作製した各種酵素液と精製ウイルス液とを等量混合し、ゴム栓にて密栓し、所定の温度に調節せる恒温槽中に120分間作用させた。0, 60, 120分後の液中のウイルス活性をマウス脳内接種により LD₅₀ (per 0.02 ml, 以下同様)を測定し、あるいはハムスター腎細胞培養への接種による TCID₅₀ (per 0.2 ml, 以下同様)により測定し、同時に酵素を含めぬウイルス液を対照として検した¹⁾。

5. トリプシン前処理 JBE ウイルスに対するリボヌクレアーゼの作用：

部分精製された JBE ウイルスをトリプシンで37°C, 1時間処理した後、冷却しつつ速やかに0.07 M PB(pH 7.2)で100倍に希釈しトリプシン作用を減弱せしめ、その後等量の0.25%リボヌクレアーゼ液を添加、37°Cで120分間作用させ、各時間のウイルス活性を測定した。

実験成績

1. JBE ウイルスの pH による安定性：

Fig. 1 に示されるごとく、JBE ウイルスは pH 3.0~5.0 の酸性領域においては37°C, 3時間後になん

Fig. 1 Effect of pH on the stability of partially purified JBE virus

化されることが認められた。また pH 8.0 以上のアルカリ性領域においても不安定なようであり、しかして本ウイルスの安定領域はこの種の条件下においては大体 pH 6.0~8.0 であることが分つた。

2. JBE ウイルスに対する酵素の作用

a) 蛋白分解酵素の作用：

JBE ウイルスは供試したこれら3種類の蛋白分解酵素によって、37°C, 120分後に影響を受けた。すなわち、

Fig. 2 Effect of some proteolytic enzymes on the infectivity of partially purified JBE virus

Fig. 2 に示されるごとく、トリプシンを作用させた場合 60 分後におけるウイルス生残率は 56 % であり、120 分後においては殆んど 0 であった。検討した他の数種の酵素に比して不活性化作用の大なることが認められた。細菌中性プロティナーゼにおいては 60 分後の生残率は 56 %、120 分後においては 5.6 % であった。パペインにおいては作用 60 分後に殆んど影響を受けず、120 分後の生残率は 10 % であった。このような差違は供試した酵素の純度およびウイルス粒子側の要素によることが考えられるが詳細は不明である。

b) 脂質分解酵素の作用：

現在リパーゼとしては数種の標品が市販されているが何れも純度において高度のものが得がたき実状にあり、しかもそれぞれの製品のもの材料によつて酵素作用も若干異なるようである故、3 種類の原材料を異にするリパーゼを実験に供した。豚リパーゼはその原材料より考えて他の蛋白分解酵素の混在の可能性が多い故、カビ性リパーゼの作用もあわせて検した。使用したカビ性のリパーゼは最近大阪市大理学部福本研究室においてその結晶化が成功し、その性質も詳細に調べられている故、最も信頼すべき標品の 1 つであると考えられる。実験の結果、豚リパーゼによつて JBE ウイルスは作用 60 分後に非常に強い不活化作用を受けた。カビ性のリパーゼに

Fig. 3 Effect of some lipolytic enzymes on the infectivity of partially purified JBE virus

よりも明らかに不活化作用が認められ、60 分後の生残率は 5.6 %、120 分後においては 3.2 % であった。これに反し麦芽リパーゼによりてはこのような条件下では殆んど有意の作用を受けなかった (Fig. 3 参照)。

c) リゾチームおよびその他の酵素の作用：

リゾチームは主としてグラム陰性菌の cell wall を分解し強い溶菌作用を示すことが認められているが、この酵素の本ウイルスに対する影響は認められなかった。また α -アミラーゼもこの種の条件において作用しないようであった。他方最近のウイルス粒子に関する広範囲な物理、化学的研究よりウイルス核酸の種々の役割が重要視されているが、少なくともこのような実験条件に関する限り、完全な (成熟した) ウイルス粒子に対してはリボヌクレアーゼ作用を認めることができなかった (Fig. 4 参照)。

Fig. 4 Effect of lysozyme, α -amylase, or ribonuclease on the infectivity of partially purified JBE virus

d) トリプシン前処理ウイルスに対するリボヌクレアーゼの作用：

以上の実験成績より、本ウイルスはトリプシン作用によりて、37°C、60~120 分間にかなり著明な不活化作用を受けることが判明したので、ある程度蛋白分解酵素で粒子を前処理したのちリボヌクレアーゼ作用を検討する目的からこのような実験を行なったが有意の影響は認め

られなかった。しかしながらこの種の実験に関しては追って詳細に検討すべき問題であると思われる (Fig. 5 参照)。

Fig. 5 Effect of ribonuclease on the infectivity of trypsin-treated (1 hour at 37°C) JBE virus

3. デング熱、黄熱、ならびに WEE ウイルスに対する酵素の作用：

部分的に精製されたデング熱ウイルスに対するトリプシンもしくは胰リパーゼの影響を検討した結果、トリプシン作用によりては 37°C, 120 分後のウイルス生残率は殆んど 0 であり、胰リパーゼ作用によつては 120 分後の生残率は約 3.2 % であつた。この点は JBE ウイルスの場合と若干異なつた結果が得られているが、この差異の詳細な点に関しては未検討である。

部分精製された黄熱ウイルスはトリプシンもしくは胰リパーゼ作用によつては 120 分後のウイルス生残率は 0.1 % であり、JBE ウイルスの場合に比してそれ等の影響は若干弱いようであつた。

Arbor A 群に属する WEE ウイルス (Rockefeller 研究所保存株) を用い、部分精製されたウイルス粒子に対して前記同様にトリプシンもしくは胰リパーゼの影響を検討した。その結果トリプシン作用による 120 分後のウイルス生残率は 0.001 %, 胰リパーゼによりては殆んど 0 であり、比較的強い不活化作用を蒙つた (Fig. 6 参照)。

4. ポリオウイルスに対する酵素の作用：

是迄の実験成績をさらに他の種のウイルスと比較検討する目的から、物理、化学的に比較的安定なるポリオウイルスを供して同様な実験を行なつた。その結果、胰リパーゼによりては 37°C, 120 分間の作用で全く影響を受けず、またトリプシンによりても前記 4 種の Arbor ウイルスの場合に比してそれらの影響は非常に弱く、ウイルス生残率は 5.6 % であつた (Fig. 7 参照)。

Fig. 6 Effect of trypsin or pancreatic lipase on the infectivity of partially purified arbor viruses

Fig. 7. Effect of trypsin or pancreatic lipase on the infectivity of partially purified poliovirus

考 察

以上のごとき実験成績より著者の用いた実験条件の下では4種の Arbor ウイルス (JBE, デング熱, 黄熱, および WEE ウイルス) は供試した酵素に対しておおむね類似した態度を示し, 特にトリプシンもしくは胰リパーゼより容易に不活化されることが認められ, この点に関しポリオウイルスとは判然たる差違が証明された。

従来からの実験的証明によると一般に Arbor ウイルスはエーテル処理によつて容易に活性を失う⁶⁾ がポリオウイルスは失活され難い。そして高度に精製, 濃縮されたポリオウイルスの標品に関する化学分析値によると脂質が殆んど含有されていない。また一般に腸内ウイルスは種々の消化酵素によつて影響を受け難いようである⁹⁾。このようなウイルス種間の粒子性状の差が何か酵素作用に対する感受性の差と関係することも大いに推察されるから, 上のごとき実験結果から今後さらに追求すべき種々の課題を提供するものと考えられた。

JBE ウイルスに対するリボヌクレアーゼの作用について著者の行なつた実験条件のもとでは完全なウイルス (いわゆる Intact virus) には作用し難い。さらに未だ詳細に検討されたとはいえないが, トリプシン前処理後のリボヌクレアーゼ作用に関しても有意の差は認められなかつた。一方粗ウイルス粒子に対する冷フェノール処理によつて得られた JBE ウイルスの感染性 RNA⁹⁾あるいは黄熱ウイルス (17D株) より抽出された感染性 RNA²⁴⁾は低濃度のリボヌクレアーゼによつて速やかにそれ等の感染力を失つた。

最近 Ada 等(1960, 1961)^{4,5)}は Murray Valley encephalitis virus に対する Phospholipase A もしくは Lipid solvent の影響に関する実験成績より推論してこの種の Arbor ウイルス粒子における感染力の役割に対して脂質の重要性を強調している。

著者の使用した JBE ウイルスをはじめとする 2, 3 の Arbor 群ウイルスは一般に不安定でしかも感染細胞よりの収量も必ずしも高くはないから現在のところ高度精製されたウイルス材料に関する正確な分析値が得られていないが, 上記の実験結果から, これ等のウイルス粒子の構成成分として蛋白および脂質もウイルスの感染性に重要な意義を有するものと考えられた。また著者等は別の実験²⁰⁾において, トリプシンもしくはリパーゼ処理を受けた JBE ウイルスの抗原性がウサギにより検討された結果によると, 何れの酵素によつても抗原性は若干低下することが証明された。

種々の酵素によるウイルス不活化作用の機作は基質の分解によつてもたらされる感染力の低下, あるいはウイルス-酵素分子複合体の可逆的形成などかなり複雑な過

程のあることがこれまで論じられている⁹⁾ から, 次の段階として純度の高い酵素標品と高度精製されたウイルス材料との組合せから不活性化作用の機作が解析されるべきであると思われる。

総 括

部分精製された JBE ウイルス粒子に対する種々の酵素の影響を検討し, さらにその他のこれに関連せる Arbor ウイルスおよびポリオウイルスに対するトリプシンあるいはリパーゼの影響を比較観察した結果, 以下のごとき若干の知見が得られた。

1) JBE ウイルス (G 1 株) は 0.125 % トリプシンにより 37°C, 60~120 分において著明なる不活性化作用を受け, またパパンあるいは細菌中性プロティナーゼによつても弱度の不活性化作用が認められた。

2) 3 種類の異なつたリパーゼを用いて JBE ウイルスに対する影響を観察した結果, 0.125 % 胰リパーゼにより, 37°C, 60 分以内に殆んど完全にウイルスの不活性化がもたらされた。さらに高度に精製されたカビ性リパーゼによつても明らかな影響を蒙つた。しかし同様の条件下に麦芽リパーゼの影響は殆んど認められなかつた。

3) その他リゾチーム, α -アミラーゼおよびリボヌクレアーゼはそれぞれ単独で JBE ウイルス粒子に対して影響を与えないようであつた。またトリプシン前処理ウイルス粒子に対してもリボヌクレアーゼの不活性化作用は認められなかつた。

4) デング熱, 黄熱および WEE ウイルスは何れもトリプシンもしくは胰リパーゼの作用により 37°C, 60~120 分間に有意の影響を受け互に類似した態度を示した。一方ポリオウイルスはトリプシンにより若干の活性の低下を生じるようであつたが, 胰リパーゼによりてはこの種の作用条件下に全く影響を受けなかつた。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜つた堀田進教授並びに種々の御助力を賜つた大山昭夫助教授, 研究室の諸兄に厚く感謝致すと共に, 貴重なる酵素標品を御分与せられた大阪市立大学理学部福本寿一郎教授に厚く感謝の意を表します。

尙この研究の費用の一部は文部省科学研究費の援助によつたことを附記致します。

Summary

In the previous papers the author reported that Japanese B encephalitis and some other arbor viruses were partially purified by ECTEOLA-Cellulose column chromatography or fluorocarbon deproteinization.

The present paper describes that the partially

purified viruses were treated with several enzymes and tested for sensitivity to the enzymes.

The enzymes used were trypsin, papain, bacterial proteinase, pancreatic lipase, fungal lipase, wheat-germ lipase, α -amylase, ribonuclease, and lysozyme. The enzymes, except for fungal lipase, were dissolved in 0.07 M phosphate buffer solution (pH 7.2) at a final concentration of 0.125% and fungal lipase was diluted with 0.07 M phosphate buffer solution (pH 6.0) to a final concentration of 125 u/ml; one unit decomposes 1% of 2g of olive oil after exposure of 2.5 hours at pH 5.6 and temperature of 30°C. The partially purified viruses tested were Japanese B encephalitis, G1 strain; dengue fever type 1, Mochizuki strain; yellow fever, strain 17 D; Western equine encephalitis, Rockefeller Institute stock strain; and poliovirus, strain MEF-1. The viruses were mixed with enzymes, incubated at 37°C (except for fungal lipase which was incubated at 30°C) for 1 to 2 hours, and titrated for active virus contents by inoculation into either mice or tissue culture tubes. In controls, phosphate buffer solution was used in place of enzyme solution.

Results obtained are summarized as follows:

1) The infectivity of Japanese B encephalitis and other arbor viruses examined decreased markedly, or was lost completely, by trypsin or pancreatic lipase within 2 hours at 37°C. However, poliovirus was resistant to these enzymatic digestion.

2) Papain, bacterial proteinase, or fungal lipase also decreased (though less than trypsin or pancreatic lipase did) the infectivity of purified Japanese B encephalitis virus. On the other hand, wheat-germ lipase, lysozyme, α -amylase, and ribonuclease exerted little effect on the infectivity of the same virus.

3) When purified Japanese B encephalitis virus was treated with trypsin for 1 hour at 37°C and then exposed to ribonuclease for 2 hours, there was no reduction in viral infectivity.

It was finally concluded from the above results that trypsin and pancreatic lipase have an effect on substances controlling the infectivity of some arbor viruses. Although infective ribonucleic acid can be extracted from tissues infected with some arbor viruses, the intact virus particles are apparently resistant to ribonuclease. The various enzyme-sensitivities on the purified virus materials, in terms of the decrease of infectivity, are different from virus to another. Although the precise mechanism underlying the observed phenomena has remained unexplained, the enzymatic inactivation experiments may serve to analyse chemical structures of virus particles.

文 献

- 1) 赤堀四郎(1956): 酵素研究法, 第2巻, 朝倉書店 東京. —2) 天野重安(1958): ウイルス学の進展, 第1集, 金芳堂, 東京. —3) Amos, H. (1953): The

inactivation of herpes simplex virus by phosphatase enzymes. *J. Exp. Med.*, 98 : 365-372. —4) Anderson, S. G. and Ada, G. L. (1960): A lipid component of Murray Valley encephalitis virus. *Nature*, 188 : 876. —5) Anderson, S. G. and Ada, G. L. (1961): The action of phospholipase A and lipid solvents on Murray Valley encephalitis virus. *J. Gen. Microbiol.*, 25 : 451-458. —6) Andrews, C. H. and Horstman, D.M. (1949): The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J. Gen. Microbiol.*, 3 : 290-297. —7) Bauer, C. W. and Wilson, E. E. (1947): The lipolytic activity of pancreatin, U.S. P. J. Amer. Pharm. Ass., 36 : 109-112. —8) Brown, A., Itatani, M.K. and Moulder, J.W. (1952): The effect of trypsin and other enzymes on feline pneumonitis virus. *J. Infec. Dis.*, 91 : 184-190. —9) Burnet, F. M. and Stanley, W. M. (1959): *The Viruses. Vol. 1, General Virology.* Academic Press Inc., New York. —10) Cheng, P. (1958): The inactivation of group B arthropod-borne animal viruses by proteases. *Virology*, 6 : 129-136. —11) Cleland, R. and Sagg, J.Y. (1960): Effect of trypsin on a susceptible strain of influenza A virus. *J. Imm.*, 85 : 539-545. —12) Gresser, I. and Enders, J. F. (1961): The effect of trypsin on representative myxoviruses. *Virology*, 13 : 420-426. —13) Harris, J.I. and Knight, C.A. (1952): Action of carboxypeptidase on tobacco mosaic virus. *Nature*, 170 : 613-614. —14) Knight, C. A. (1955): The action of carboxypeptidase on strains of tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.*, 214 : 231-237. —15) Luria, S.E. (1953): *General Virology.* John Wiley & Sons Inc., New York. —16) Machlowitz, R. A., Spicer, D. S., Buynak, E. B. and Tytell, A. A. (1961): The effect of trypsin on measles virus antigenicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 108 : 508-512. —17) Morris, M.C. (1952): The effect of trypsin on hemagglutination by murine encephalomyelitis virus (GD VII). *J. Imm.*, 68 : 97-108. —18) Nishimura, C. and Tagaya, I. (1960): Enzymic inactivation of vaccinia virus with a bacterial protease. *Jap. J. Med. Sci. and Biol.*, 13 : 165-167. —19) Reed, L. J. and Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27 : 493-497. —20) 竹原学, 徳地幹夫, 大山昭夫, 堀田進 (1961): 日本脳炎ウイルスの精製に関する研究 (続報). 第8回日本ウイルス学会記録, ウィルス, 11 233-234. —21) 竹原学, 堀田進 (1961): 2, 3のArbor ウィルスの感染性 RNA に関する研究, 第9回日本ウイルス学会総会演説抄録, p. 35-36. —22) 竹原学 (1962): ARBOR 群ウイルスの化学的性状に関する研究, 第1報 日本脳炎ウイルスの部分的精製, ウィルス, 投稿中. —23) 竹原学 (1962): ARBOR 群ウイルスの化学的性状に関する研究, 第2報 デング熱ウイルスおよびその他 2, 3の ARBOR ウィルスの部分的精製. ウィルス, 投稿中.