インフルエンザ A 及び B 型ウイルスノイラミニダーゼ間の酵素学的な差異について

武井直巳¹⁾・清谷克寛²⁾・妹尾正登¹⁾
松尾吉恭²⁾

(受付: 昭和60年10月24日)

ことは極めて興味あることと思われる。

総 括

インフルエンザ A 及び B 型ウイルスノイラミニダーゼ (NA) 間の酵素学的な差異を明らかにすることを目的として, A, B 両型ウイルス各10株ずつについて, フェチュインを基質として用いる呈色比色法と, 4-メチルウンベリフェリル-N-アセチル- α -D-ノイラミニド (4-MU-ノイラミニド) を基質として用いる蛍光比色法とによって, そのNA活性を測定した。

蛍光比色法では, A型ウイルスのNAは, 10mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) により著明に抑制されたのに対して, B型ウイルスのそれは全く抑制されなかった。

B型ウイルスNAの加水分解活性の呈色比色法/蛍光比色法の比は, A型ウイルスのそれに比して著明に高かった。また, B型ウイルスのNAはN-アセチルノイラミニン酸 (NANA) による競合阻害の程度も, A型ウイルスのNAにおけるよりも弱く, A, B両型ウイルスNA間の基質特異性に差のあることが示唆された。

A, B両型インフルエンザウイルスNAについて, 4-MU-ノイラミニドという低分子の合成基質を用いる蛍光比色法を応用することで, 両者が異なる態度を示した

序 文

NA (N-acetylneuraminatase glycohydrolase, EC 3. 2. 1. 18) は, オルソミクス及びパラミクソウイルスの他, 細菌, 原虫及び脊椎動物細胞や発育鶏卵の漿尿膜細胞などにも存在が確認されており, それぞれ酵素学上の特徴をもつことが知られている^{1, 8, 9, 16, 18)}。

インフルエンザウイルスのNAについても, その至適 pH や基質特異性にはウイルス株間でかなり差のあることが知られている^{2, 6, 7, 9, 14, 16)}。しかし, Ca^{2+} イオン依存性という点については, これまで A, B 両型ウイルス間には違いはなく, とともに EDTA 存在下で著明にその活性が抑制されるとされてきた^{5, 6, 16, 20)}。

先に我々は, Myers ら (1980)¹⁵⁾ によって合成された 4-MU-ノイラミニドを基質として用いる蛍光比色法¹¹⁾ を応用し, インフルエンザウイルスのNA活性を測定し, そのなかで B/神奈川/3/76株のNAが EDTA によって全く抑制されず, A/愛知/2/68 及び A/USSR/92/77両株のそれとは明らかに異なる特徴をもつことを報告した¹²⁾。次いで, 1940年から1984年の間に世界各地で分離された26株のB型ウイルスについて検討し, 先に示された¹²⁾ B/神奈川/3/76株のNAのもつ酵素活性の特徴が, B型ウイルス全般に共通してみられる性質であることを明らかにした¹³⁾。

そこで今回は, これまでの知見をさらに発展させるため, A型ウイルス株も含めて検討したので報告する。

材料と方法

1. 供試ウイルス株

A, B 両型インフルエンザウイルス各10株を供試した。この内, 広島県下の流行例より分離された2株のB型株を除く各ウイルス株は, 国立予防衛生研究所, 武内安恵

Enzymologically Different Characteristics between Influenza A and B Virus Neuraminidases.

Naomi TAKEI¹⁾, Katsuhiko KIYOTANI²⁾, Masato SENOO¹⁾, and Yoshiyasu MATSUO²⁾ (Hiroshima Prefectural Institute of Public Health¹⁾ and Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine²⁾)

1) 広島県衛生研究所生物学部

2) 広島大学医学部細菌学教室

〒734 広島市南区宇品神田 1-5-70

Table 1. Hemagglutination titer and neuraminidase activity of various influenza viruses

Influenza virus	HA titer	Neuraminidase activity ¹⁾		
		Fluorometry	Colorimetry	Ratio
Type A (H1N1)				
A/PR/8/34	512	25,900	70,800	2.7
A/FM/1/47	1,024	45,500	110,000	2.4
A/Omachi/1/53	512	5,900	11,460	1.9
A/USSR/92/77	1,024	62,800	56,300	0.9
Type A (H2N2)				
A/Adachi/2/57	512	142,000	628,800	4.4
A/Singapore/1/57	256	127,000	691,200	5.4
Type A (H3N2)				
A/Aichi/2/68	512	71,780	380,800	5.3
A/Portchalmers/1/72	1,024	131,000	337,600	2.9
A/Victoria/3/75	512	92,400	320,000	3.5
A/Bangkok/1/79	512	32,100	56,400	1.8
Type B				
B/Lee/40	256	10,060	109,200	10.9
B/Setagaya/3/56	1,024	9,060	132,880	14.7
B/Taiwan/4/62	512	7,600	129,440	17.0
B/Tokyo/7/66	256	4,860	91,400	18.8
B/Osaka/2/70	1,024	8,800	141,280	16.1
B/Gifu/2/73	256	10,360	162,880	15.7
B/Kanagawa/3/76	256	7,700	119,840	15.6
B/Singapore/222/79	512	7,300	132,400	18.1
B/Hiroshima/3/83	256	4,786	89,600	18.7
B/Hiroshima/2/85	128	2,220	42,960	19.4
Partially purified virus preparation ²⁾				
B/Lee/40	64	4,180	40,400	9.7
B/Taiwan/4/62	1,024	6,460	88,960	13.8
B/Gifu/2/73	2,560	136,600	1,180,000	8.6
B/Kanagawa/3/76	5,120	283,000	2,822,247	10.0
B/Singapore/222/79	5,120	180,000	2,040,000	11.3

1) Neuraminidase activity was measured fluorometrically using 4-MU-N-Ac- α -D-neuraminide and colorimetrically using fetuin as substrate. Enzyme activity was expressed as pmol/hr/100 μ l of sample and the ratio was calculated as enzyme activity measured by colorimetric assay/fluorometric assay.

2) Virus preparations were grown in MDCK cells and partially purified by differential centrifugation.

博士より分与を受けた。これらのウイルス株は全て再度発育鶏卵に接種し、その感染漿尿液をウイルス液として使用した。また、一部のB型株については、MDCK細胞で培養したウイルス液を分別遠心にて部分精製したものを用いた。

2. NA活性の測定

NA活性の測定は2種類の異なる測定系で行った。呈色比色法はフェチュイン (Type III, Sigma Chemicals,

USA) を基質として Aymard-Henry ら (1973)³⁾ の方法に準じて行い、蛍光比色法は 4-MU-ノイラミニド (Koch Light Laboratories, England) を基質として既に報告した方法¹¹⁾に準じて行った。反応時間は前者では 37°C 18時間、後者では 150 分とし各々遊離してきた NA NA 及び 4-MU を定量し、活性は用いたウイルス液 100 μ l 当り 1 時間値で示した。

各 NA 活性に及ぼす EDTA 及び NANA の影響の

Table 2. Effect of EDTA and N-acetylneuraminic acid on influenza viral neuraminidase activity

Influenza virus	% Activity with		
	10 mM EDTA ¹⁾		25 mM NANA ²⁾
	Fluorometry	Colorimetry	
Type A (H1N1)			
A/PR/8/34	15	7	29
A/FM/1/47	22	6	47
A/Omochi/1/53	5	7	25
A/USSR/92/77	10	12	23
Type A (H2N2)			
A/Adachi/2/57	24	29	38
A/Singapore/1/57	27	29	36
Type A (H3N2)			
A/Aichi/2/68	48	79	22
A/Portchalmers/1/72	45	26	27
A/Victoria/3/75	20	9	25
A/Bangkok/1/79	3	5	38
Type B			
B/Lee/40	120	13	83
B/Setagaya/3/56	130	50	81
B/Taiwan/4/62	149	53	86
B/Tokyo/7/66	132	47	73
B/Osaka/2/70	127	49	83
B/Gifu/2/73	124	51	82
B/Kanagawa/3/76	118	50	87
B/Singapore/222/79	116	48	73
B/Hiroshima/3/83	116	46	96
B/Hiroshima/2/85	103	55	75
Partially purified virus preparation			
B/Lee/40	117	2	90
B/Taiwan/4/62	137	56	71
B/Gifu/2/73	112	41	75
B/Kanagawa/3/76	110	51	88
B/Singapore/222/79	118	53	88

1) Percent activity was calculated as follows: (enzyme activity with 10 mM EDTA/without EDTA) x 100.

2) Percent activity measured fluorometrically using 4-MU-N-Ac- α -D-neuraminide as a substrate was calculated as follows: (enzyme activity with 25 mM NANA/without NANA).

測定に当っては、各ウイルス液のNA活性をそれぞれ 10 nmol/時間/100 μ l (呈色比色法) 及び 400 pmol/時間/100 μ l (蛍光比色法) に調製し、2 mM CaCl₂ 加反応液に EDTA 10 mM あるいは NANA (Type VI, Sigma Chemicals, USA) 25 mM を添加して測定した。

成 績

1. 蛍光比色, 呈色比色両測定法におけるNA活性
両測定法における各ウイルス液のNA活性をまとめて

Table 1 に示した。成績は、個々の活性値とともにそれらの両測定法における活性の比 (呈色比色法の活性/蛍光比色法の活性) をとって比較する形で記載した。

A型ウイルスでは、呈色比色法の活性が蛍光比色法のその2～5倍強い値 (平均3.1倍) であった。これに対して、B型ウイルスでは呈色比色法のそれが蛍光比色法のそれより10～20倍も強く、両測定法の活性比の平均は16.5であった。部分精製ウイルス液においてもほぼ同様の傾向であった。

2. EDTA 及び NANA 添加の影響

10 mM EDTA 添加の影響を呈色比色, 蛍光比色両測定法で, また 25 mM NANA 添加による影響を蛍光比色法で測定し, 成績を Table 2 に示した.

A型ウイルスにおいては, ウイルス株間で程度の差はあるものの EDTA 添加により両測定系ともにその活性は強く抑制され, 両測定法における活性抑制率の平均はそれぞれ 78.1%及び 79.1%であった. しかし B型ウイルスでは, 呈色比色法では A型ウイルスのそれと比較するとかなり弱いものの平均 53.8%の抑制が認められたが, 蛍光比色法では全く抑制はみられなかった.

一方, NANA による競合阻害の程度は, A型ウイルスでは平均 69.0%と強く抑制されたが, B型株の活性抑制の程度は平均 18.1%と A型ウイルスのそれと比較して著明に低かった. 同様のことは部分精製ウイルス液でも認められた.

考 察

以上の成績から, まず両測定系における供試 A, B 両型ウイルス間の NA 活性は, フェチインを基質とする場合と 4-MU-ノイラミドを基質とする場合とではその活性に明らかに差が認められる (Table 1). 勿論呈色比色法と蛍光比色法とは異なった測定系であり, 用いる基質も異なるが^{15,17)}, それぞれの単位当りの活性値を指標とすることによって両者は比較しうるものと思われる. したがって, この加水分解の差は A, B 両型ウイルス NA のそれぞれの基質に対する加水分解の程度をそのまま反映しているものと解される.

一般にはウイルス, 細菌あるいはそれ以外のものに由来するは NA は, N-アセチル及び N-グリコリルの 2 種のノイラミン酸の内 NANA をより効果的に水解するとされているが⁷⁾, その逆の場合のあることも知られている⁷⁾. フェチインは上記 2 種のノイラミン酸を含むが, そのフェチインに対して B型ウイルスの NA が A 型に比べて強い加水分解活性を示したことは, NANA による競合阻害にも, A, B 両型ウイルス間で差の認められる (Table 2) ことと併せて興味深い. これらのメカニズムについては現段階では言及できない.

次に, インフルエンザウイルス NA の EDTA に対する態度については, 初期において主として A型ウイルスについて行われた仕事^{5,19)}を除いてはその後系統的に検討された報告は少ない. その中にある EDTA 非感受性の NA についての報告はない. この点に関する最近の報告としては Yolken ら (1980)²⁰⁾のものがあるが, 彼らは蛍光比色法を用い, 10 mM EDTA により A, B 両型インフルエンザウイルスの NA は共に著明に抑制さ

れたと報告している. 我々はこの点に関して, 4-MU-ノイラミドを基質とする蛍光比色法では, B型ウイルスの NA 活性が 10 mM EDTA で全く抑制されないことをみたが^{12,13)}, この違いの理由は現在のところ不明である. 一方, A型ウイルスの NA 活性は, 10 mM EDTA 添加によって呈色, 蛍光の両測定系とも著明に抑制され, この点ではこれまでの諸報告^{5,6,16,19)}と一致した.

これとは別に, インフルエンザウイルス NA の温度に対する安定性についての Ca^{2+} イオンの役割について, Baker and Gandhi (1976)⁴⁾は Ca^{2+} イオン非存在下では, 37°C においても活性低下のみられることを指摘している. しかし, 今回我々がみた両測定法における B型ウイルス NA の Ca^{2+} イオン依存性の差は, これまでの測定系の検討から両測定法の反応時間の差による NA の安定性に基づくものとは考えられない.

なお, これまで述べた A, B 両型インフルエンザウイルス NA の酵素学的特徴が, 宿主細胞由来の因子や, 混入細菌由来のものでないことは, MDCK 細胞由来の B型ウイルスの部分精製ウイルス液を用いた成績からチェックされたものと考えている.

以上, 今回の成績は A, B 両型インフルエンザウイルス NA 間には, その基質特異性及び Ca^{2+} イオン依存性において全く同一ではなく, 低分子単純基質を用いることによって表現されうような違いのあることを示唆するものと考えられるが, なお今後の検討が必要である.

謝 辞

稿を終るにあたり, インフルエンザウイルス株を分与して下さった国立予防衛生研究所の武内安恵博士に深謝いたします.

文 献

- 1) Ada, G. L. and Lind, P. E. (1960). Neuraminidase in the chorioallantois of the chick embryo. *Nature* 227: 1169-1171.
- 2) Aoyagi, T., Komiyama, T., Nerome, K., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1975). Characterization of myxovirus sialidase. *Experientia* 31: 896-898.
- 3) Aymard-Henry, M., Coleman, M. T., Dowdle, W. R., Laver, W. G., Schild, G. C. and Webster, R. G. (1973). Influenza virus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull. WHO* 48: 199-202.
- 4) Baker, N. J. and Gandhi, S. S. (1976). Effect of Ca^{2+} on the stability of influenza virus neuraminidase. *Arch. Virol.* 52: 7-18.
- 5) Boschman, T. A. C. and Jacobs, J. (1965). The

- influence of ethylenediaminetetraacetate on various neuraminidases. *Biochemische Zeitschrift* **342**: 532-541.
- 6) Bucher, D. and Palese, P. (1975). The biologically active proteins of influenza virus : Neuraminidase. In: E. D. Kilbourne (Ed.), *The influenza virus and influenza*, p. 83-123. Academic Press, New York San Francisco London.
 - 7) Corfield, A. P., Veh, R. W., Wember, M., Michalski, J-C and Schauer, R. (1981). The release of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid from soluble complex carbohydrates by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem. J.* **197**: 293-299.
 - 8) Drzeniek, R. (1972). Viral and bacterial neuraminidases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **59**: 35-74.
 - 9) Gottschalk, A. and Drzeniek, R. (1972). Neuraminidase as a tool in structural analysis. In: A. Gottschalk (Ed.), *Glycoprotein Part A*, p. 381-402. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
 - 10) Graham, E. R. B. (1966). Serum glycoproteins. In: A. Gottschalk (Ed.), *Glycoproteins*, p. 356-361. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
 - 11) Kiyotani, K., Takei, N. and Matsuo, Y. (1984). Fluorometric measurement of neuraminidase activity of influenza viruses. *Hiroshima J. Med. Sci.* **33**: 287-292.
 - 12) 清谷克寛 (1984). インフルエンザウイルス B/神奈川/3/76 株のカルシウム非依存性ノイラミニダーゼ活性. *医学と生物学*, **109**: 83-86.
 - 13) Kiyotani, K., Takei, N. and Matsuo, Y. (1985). Enzymological heterogeneity of influenza B virus neuraminidase demonstrated by the fluorometric assay method. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **260**: 273-285.
 - 14) Lin, W., Oishi, K. and Aida, K. (1977). Specific inhibition of viral neuraminidases by an inhibitor, Neuraminin, produced by *Streptomyces* sp. *Virology* **78**: 108-114.
 - 15) Myers, R. W., Lee, R. T., Lee, Y. C., Thomas, G. H., Reynolds, L. W. and Uchida, Y. (1980). The synthesis of 4-methylumbelliferyl- α -ketoside of N-acetylneuraminic acid and its use in a fluorometric assay for neuraminidase. *Anal. Biochem.* **101**: 166-174.
 - 16) Rafelson, M. E., Jr. (1963). The neuraminidases and their action on glycoproteins and other sialic acid-containing compounds. *Expos. Ann. Biochem. Med.* **24**: 121-132.
 - 17) Spiro, R. (1960). Studies on fetuin, a glycoproteins of fetal serum. I. Isolation, chemical composition and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* **235**: 2860-2869.
 - 18) Warren, L. and Spearing, C. W. (1960). Mammalian sialidase (Neuraminidase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**: 489-492.
 - 19) Wilson, V. W., Jr. and Rafelson, M. E., Jr. (1967). Studies on the neuraminidases of influenza virus. III. Stimulation of activity by bivalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* **146**: 160-166.
 - 20) Yolken, R. H., Torsch, V. M., Berg, R., Murphy, B. R. and Lee, Y. C. (1980). Fluorometric assay for measurement of viral neuraminidase—Application to the rapid detection of influenza virus in nasal wash specimens. *J. Infect. Dis.* **142**: 516-523.

Enzymologically Different Characteristics between Influenza A and B Virus Neuraminidases

Naomi TAKEI¹⁾, Katsuhiko KIYOTANI²⁾, Masato SENOO¹⁾, and Yoshiyasu MATSUO²⁾

- 1) Hiroshima Prefectural Institute of Public Health, 1-5-70, Ujina Kanda, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan.
- 2) Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan.

Neuraminidase (NA) activity of 10 strains of influenza A and 10 strains of influenza B virus was determined by fluorometric and colorimetric assays using 4-methylumbelliferyl (4-MU)-N-Ac- α -D-neuraminide and fetuin as the substrate, respectively.

The ratio of NA activity measured by colorimetric assay to that measured by fluorometric assay was significantly higher with influenza B virus than with influenza A virus. When measured by fluorometric assay, NA activity of influenza A virus was strongly inhibited by ethylenediaminetetraacetate, while that of influenza B virus was not. Influenza B virus NA was also significantly less susceptible to competitive inhibition by N-acetylneuraminic acid than influenza A virus NA, suggesting the different substrate specificity of the two NAs.

It is worth to note that such an enzymological heterogeneity between influenza A and B virus NAs is demonstrated only by the use of a low molecular weight synthetic substrate, 4-MU-N-Ac- α -D-neuraminide and fluorometric assay.