

## 化学療法的活性をもつ生体成分の研究 V

Antivirin の特性, 特にその熱抵抗性と蛋白分解酵素抵抗性について

瀬戸淑子・戸根木尚子・豊島 滋

慶応義塾大学医学部薬化学研究所生物薬品化学研究室

(昭和 43 年 7 月 11 日受付)

前報<sup>1-3)</sup>において、我々は Interferon 生産促進因子を作用させない細胞培養系で Interferon<sup>4)</sup>とは異なる新しい蛋白性の高分子ウイルス増殖阻止因子の生産されることを見出し、これを Antivirin と名付けた。Antivirin(以下, AV)は Interferon(以下, IF)と次のような点で異なる新しいウイルス阻止因子である。(1) AV はその生産のために IF-inducer(s)を必要としない。(2) AV は host species-specificity がほとんど認められない。(3) AV の活性は熱安定性で 100°C, 10~60 分の加熱によつても失活されない。(4) AV の活性は蛋白分解酵素処理によつて失活されない。このような AV の性状は, AV が蛋白性のものでないことを示唆しているように一見みられるが, AV は紫外部吸収スペクトルに於いて 280 m $\mu$  に極大吸収帯を, 245 m $\mu$  に最少吸収帯を有し, 各種の蛋白呈色反応に陽性反応を示すことは AV がやはり蛋白性性格のものであることを示している。このような AV の耐熱性, 及び耐蛋白酵素性は AV の際立つた特長であり, この点を解明することにより AV の性格を明かにすることが出来るであろう。

この報文は, AV の耐熱性及び耐蛋白分解酵素性の解明についてである。

## 実験材料および方法

培養細胞: 全実験を通じて, Hep. No. 2 細胞を用いた。増殖培地には 15% 牛血清加 YLA 培地を用い, 維持培地には 5% 牛血清加 YLA 培地を用いた。

ウイルス材料: Polio 1 型 Mahoney 株ウイルスを使用した。ウイルス量の測定は plaque assay 法によつた。Hep. No. 2 細胞の単層細胞を含むブラック瓶にウイルス希釈液 0.3 cc を加え, 37°C 60 分吸着後, 4% 牛血清加 2 倍濃度 YLA と, 2.2% 精製寒天を 1:1 に混合し, 中性赤を最終濃度 3 万倍になるように加えた寒天上層培地を 4 ml 1 ブラック瓶に加え, 再び 37°C に 4 日間培養し, plaque 数を算え, plaque forming unit (PFU) を計算した。

粗 Antivirin の調整: 実験に用いた粗 AV は次のようにして調整した。Hep. No. 2 細胞の 25 万/ml を 30ml/培養瓶の割合で大型培養瓶に加え, 37°C 4 日間培養する。

単層培養層の成立した培養瓶から増殖培地を取去り, pH 7.4 の Phosphate buffered saline(PBS) で 3 回細胞を洗つた後, AV 生産のための維持培地として Eagle 培地を 30 ml 加える。37°C 5 日間培養し, その培養液を集め, 3,000 rpm, 20 分遠心して上清を集める。この上清をセロファンバッグに入れ, Carbowax 6000 により 10 倍に濃縮し, さらにこの濃縮液を蒸溜水に対して 4°C 1 夜透析し低分子成分を除去したものを粗 AV とする。

Antivirin の力価測定: 測定方法は前報<sup>2)</sup>に記述されているが, 多少変更されているところは実験の部で記述する。

ゲル濾過による分子量の測定: ゲル濾過は ANDREWS<sup>5)</sup>らの方法に従つた。Sephadex G-200 を 2.6 $\times$ 72 cm の column に積み, 0.1 M Tris—0.2 M NaCl buffer, pH 7.6 で平衡になるまで洗滌した。試料は同じ tris-buffer に溶解するか, または同一 buffer に対して 1 夜透析を行なつた後, カラムに 1~2 cc 乗せ, 上記 buffer でゲル濾過を行なつた。カラムからの流出速度は 21 ml/hr. であつた。分画を 3 ml ずつ集め, その各分画液の吸光度を OD 215 m $\mu$  について測定した。この OD 215 m $\mu$  におけるそれぞれのピークの前後 3 分画を集め, 元量に濃縮し, 蒸溜水に対して透析後, 力価を測定した。各 OD 215 m $\mu$  ピークの分子量は次の公式に従がい計算した。

$$M^{1/3} = 152[1,480 - (v/v_0)^{1/3}]$$

## 実験結果

## 1. Antivirin 活性の測定条件の検討

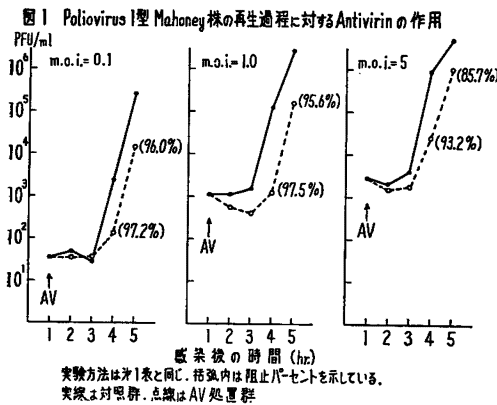
AV の活性の測定には, 従来, 感染 24 時間後の細胞外ウイルス量を測定することにより行なつていたが, より感受性の高い測定方法を求める目的で次の実験を行なつた。

Polio 1 型 Mahoney 株ウイルスを m.o.i.=0.2 で Hep. No. 2 細胞の単層培養の成立した試験管に加え, 37°C 60 分吸着させた後, PBS で未吸着ウイルスを洗いきり, AV 材料 0.3 cc と維持培地 0.7 cc を加え, 37°C に更に培養を行ない, その細胞内ウイルス量を一定時間

第1表 Antivirin の Poliovirus 1 型 Mahoney 株の再生過程に対する作用

ウイルス感染後の時間 (hr.)	PFU/ml*		阻止パーセント (%)
	対照群	Antivirin 処理群	
2	3.3×10 <sup>4</sup>	3.3×10 <sup>4</sup>	0
4	5.2×10 <sup>4</sup>	5.6×10 <sup>4</sup>	99.9
6	1.2×10 <sup>6</sup>	3.1×10 <sup>5</sup>	81.9
8	3.6×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	64.2
10	8.2×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>6</sup>	63.2
18	4.1×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	65.3
24	1.2×10 <sup>8</sup>	4.7×10 <sup>7</sup>	60.3

Hep. No. 2 の単層細胞の成立した培養瓶にウイルスを m.o.i.=0.1 で接種し、1 時間後に未吸着ウイルスを洗い去り、Antivirin 0.3 ml を含む維持培地 1.0 ml を加え、37°C で培養する。一定時間ごとに細胞内ウイルス量を測定する。



ごとに測定した。その実験結果を表 1 に示す。

表 1 に見られるように、ウイルス感染後 4 時間目から 6 時間目の細胞内ウイルス量を測定した場合に最も強い阻止作用が示されている。そこで、感染初期における AV の作用を更に詳細に検討した。

図 1-a), b), c) に見られるように、m.o.i. を変えた場合も AV の最大阻止効果は感染後 4 時間目と 5 時間目の細胞内ウイルスの抑制において最も強い。従がつて、この時期において AV の活性を測定することが、最も感度のよい力価測定条件と考えた。以下の実験では、すべて m.o.i.=5 で Polio 1 型 Mahoney 株ウイルスを接種し、感染後 4 時間目の細胞内ウイルス量を測定し、AV の力価を得た。

この AV の作用する時期は、ウイルス再生過程の立上りに相当し、ウイルス RNA 及びウイルス蛋白の合成が活潑に行なわれ、且つまた、それらの集合される時期でもある。従がつて、AV もこれらのいずれかに作用するものと思われる。この問題については次報<sup>6)</sup>に報告

される。

2. Antivirin の熱安定性と蛋白質分解酵素抵抗性について

AV はその産生条件および作用型式の他に、その性状においても Interferon 様物質とは異なるものであることは前報<sup>6)</sup>ですでに明らかにされたが、中でも大きな差は熱に非常に安定であること、蛋白質分解酵素に極めて抵抗性であることであつた。

そこで、前報で行なつたよりもさらに苛酷な条件の酵素処理および熱処理を行なつてみた。

用いた蛋白質分解酵素はすべて、ovaalbumine, bovine serum albumine, gletatine 等、数種の基質に対して、その活性を確かめ、その最大活性単位に相当する量を使用した。実験の結果は表 2 に示されている。

表 2 に明らかのように、AV は熱処理と蛋白質分解酵素に対して著しい抵抗性を示し、AV 活性は失活されなかつた。それ故に、この 2 つの Antivirin 特性を検討することにより、Antivirin の本質または本体を解明することが出来るであろうと考えられる。

3. 無処理 Antivirin の Sephadex G-200 によるゲル濾過とその分子量

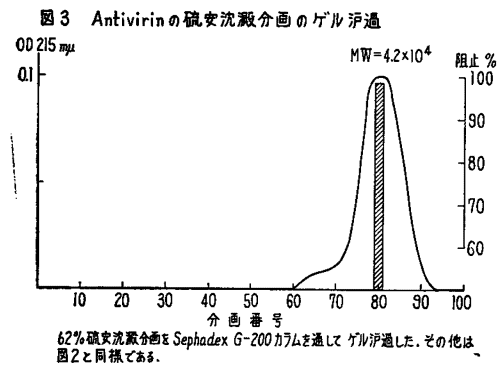
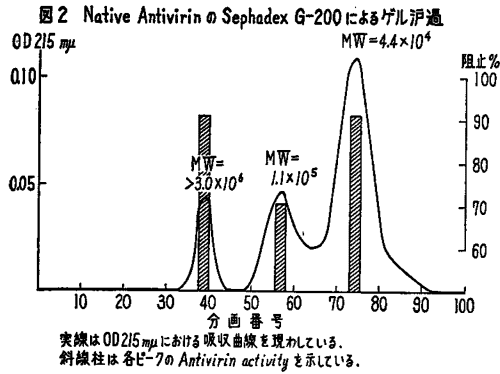
無処理の粕 AV を Sephadex G-200 を用いて、ゲル濾過を行ない、ANDREWS の方法<sup>7)</sup>に従がい分子量の測定と分布を調べた。

その結果は、図 2 に見られるように、3 つの OD 215 mμ

第2表 Antivirin の蛋白分解酵素処理と熱処理

酵素名	分解条件			失活 %
	量 (mg)	温度 (°C)	時間 (hrs.)	
Trypsin	2	37	4	0
	1	38	5	10
	1	38	18	46
	1	38	18	24
Chymotrypsin	1	38	18	0
	1	38	18	0
Pronase	0.1	38	18	39
	0.1	38	18	0
Pepsin	0.05	38	18	0

熱処理の条件			失活 %
pH	温度 (°C)	時間 (hr.)	
5	120	2	0
7	120	2	0
12	120	2	0



ピークが認められ、いずれも AV 活性を有していた。これらの活性ピーク3つは常に粗 AV 中に認められ、その各々の分子量は <30 万、10~11 万、4~5 万であった。

62% 硫酸飽和沈澱分画より得られる部分精製 AV を

同様にゲル濾過を行なつてみた。

図3に示されるように、単一な活性ピークが得られ、その分子量もまた 4.4 万であった。これらの結果から、AV はおそらく分子量 4~5 万の蛋白質であろうと思われる。そこで、分子量 4.4 万の活性部分が先の2つの耐熱性および耐蛋白分解酵素性という AV 特性を有しているかどうかを検討した。

4. ゲル濾過により得られた分子量 4.4 万の Antivirin の性状

Sephadex G-200 ゲル濾過から得た部分精製された分子量 4.4 万の Antivirin (以下、AV 4.4) について、耐熱性と耐蛋白分解酵素性を検討した。結果は表3に示した。

表3に見られるように、ゲル濾過による部分精製 AV 4.4 も同様に2つの AV 特性を満足するものであつた。従がつて、AV の本体は分子量 5 万位の蛋白質であり、これらが凝集して分子量 10 万あるいは 30 万位のもの形成するのではないかと考えられる。

5. Trypsin 作用後の Antivirin のゲル濾過

AV は蛋白質分解酵素に抵抗性であるが、酵素処理後も果して native と同様の状態を維持しているのか、あるいは酵素の作用により低分子化されているか、その活性中心は侵されないために AV 活性を保有しているかを明かにすることは AV の本体の解明のためにも興味がある。この点を明かにするため次の実験を行なつた。

AV に Trypsin を 1 mg/ml の割合で加え、38°C 18 時間作用した後、材料を3つに分け、1つはそのまま

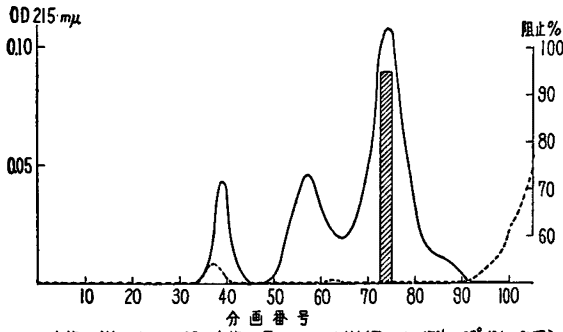
第3表 粗 Antivirin と部分精製 Antivirin (AV<sub>4.4</sub>) の性質の比較

		粗 Antivirin			部分精製 Antivirin (AV 4.4)		
		蛋白量 (mcg)	処置群 PFU/対照群	阻止 %	蛋白量 (mcg)	処置群 PFU/対照群 PFU	阻止 %
希 積 度	1/1	26	$\frac{6.6 \times 10^2}{2.0 \times 10^4}$	96.7	20	$\frac{7.2 \times 10^3}{9.3 \times 10^4}$	92.3
	1/2	13	$\frac{3.3 \times 10^3}{2.0 \times 10^4}$	83.7	10	$\frac{1.0 \times 10^4}{9.3 \times 10^4}$	89.3
	1/4	6.5	$\frac{7.8 \times 10^3}{2.0 \times 10^4}$	60.9	5	$\frac{2.7 \times 10^4}{9.3 \times 10^4}$	70.0
	1/8	3.3	$\frac{8.4 \times 10^3}{2.0 \times 10^4}$	58.0	2.5	$\frac{2.9 \times 10^4}{9.3 \times 10^4}$	68.8
	Trypsin 処理*	26	$\frac{1.1 \times 10^4}{1.7 \times 10^5}$	93.5	20	$\frac{1.3 \times 10^3}{3.1 \times 10^4}$	95.8
	熱処理**	26	$\frac{1.5 \times 10^4}{1.7 \times 10^5}$	91.2	20	$\frac{2.0 \times 10^3}{3.1 \times 10^4}$	93.5

\* Trypsin 1 mg/ml の割合で加え 37°C 18 時間処理

\*\* pH 12 に調節し、120°C 1 気圧 2 時間処理

図4 Trypsinized Antivirinのゲル濾過



実線はAV controlのOD。点線はTrypsinized AV (Trypsin 1<sup>mg</sup>/ml, 37°, 18hrs処理)のODを表わしている。

ル濾過を行ない、いま1つは、Tris buffer に対して4℃ 1夜透析を行なった後力価を測定し、残りは、そのまま力価を測定した。

実験の結果は、図4に示されたように、無処理の場合に認められる3つの活性ピークは消失している。しかしながら、全活性は残っており、この活性は透析により除かれることもない。故に、AVは一般には分子量約5万の蛋白性の物質として存在しているが、これは活性基本体ともいうべき非透析性のもつと小さい分子量のもの集合体からか、あるいは、この活性基本体に安定化基本体が結合したものであるのではないかと想像される。

#### 考 察

この報告において、AVがウイルス再生過程の初期段階、すなわち、ウイルス核酸とウイルス蛋白が活発に合成され、それらの構成因子が集合せられ、感染性成熟ウイルスを形成するまでの段階に最も強く作用することが、前報に引続いて確認された。この時期においてAVの活性を測定することにより、AVのより感度の高い力価測定条件を求めることが出来た。

AVをInterferonとの比較においてみた場合AVの極めて特異的性状はAV活性が熱および蛋白質分解酵素抵抗性であることである。この2点を考えると、AVを蛋白性物質として扱うことに疑問が起るが、高分子であること、各種蛋白呈色反応に陽性であること、蛋白沈澱試薬で沈澱すること、および210~215 mμ, 280 mμに紫外部極大吸収を有し、245 mμに極少吸収を有することから蛋白質様物質であることを否定することは出来ない。すなわち、AVは典型的の蛋白性性格と非蛋白性性格を併せ有している物質であると考えられる。

Sephadex G-200ゲル濾過により、粗AVは分子量30万以上、10~11万、4~5万と推定される3つの活性ピークを示したが、部分精製された場合は4~5万の分子量の活性ピークのみを残し、他のピークは見出されなかった。そして、この分画もまたAntivirinの特性で

ある耐熱性及び耐蛋白分解酵素性を示した。従がつて、その分子量4.4万の部分がAVの本体と考えられる。しかしながら、この分画部をTrypsin消化後Sephadex G-200でゲル濾過するとその活性は保有されるが、AVそのものは、酵素処理によりもつと低分子の、しかし透析されないくらいの大きさのものに分解されることから、AVの本体はおそらくは更に低分子の(おそらくペプチッドと思われるもの)から構成されており、それが、熱および蛋白分解酵素の作用を受けないものであると考えられる。前報に記述された硫安全飽和遠心清に認められる活性は、あるいは活性基本体と一致するかも知れないが、今後の検討に待ちたい。

#### 要 約

感染4~6時間後の細胞ウイルス増殖に対する抑制効果を指標として、Antivirin活性を測定することにより、今まで以上に鋭敏な力価測定条件をうることが出来た。Antivirin活性の耐熱性および耐蛋白分解酵素性はAntivirinの特性であることが確認された。粗AntivirinをSephadex G-200でゲル濾過を行なうと分子量30万以上、10~11万、4~5万の3つの分画が得られるが、62%硫安飽和沈澱部のAntivirinの分子量も4.4万であり、この分画も耐熱性、および耐蛋白分解酵素性を示した。また、粗AntivirinをTrypsin処理後、Sephadex G-200でゲル濾過を行なうと全Antivirin活性は保有されるが、Sephadex G-200濾過で認められるピークはない。以上の結果からAntivirinの基本体はより、低分子のものであり、nativeな状態においては分子量4~5万の作用体を形成しているものと推定される。

#### 参 考 文 献

- 1) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 高奥昌子, 藤田晴久: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究. 1. Antivirin培養細胞の生産する新しい抗ウイルス物質について. *Chemotherapy* 15: 263~266, 1967
- 2) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 同上: 2. Antivirinの生産条件と力価測定. *Chemotherapy* 15: 267~270, 1967
- 3) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 同上: 3. 部分精製されたAntivirinの性状. *Chemotherapy* 15, 271~274, 1967
- 4) ISAACS, A.: Interferon. *Advances in Virus Research* 10, 1~38, 1963
- 5) ANDREWS, P. & FALLEY, S. J.: Molecular weights of bovine, ovine and porcine pituitary growth hormones estimated by gel-filtration on sephadex. *Biochem. J.* 87, 3 p. abstr., 1963
- 6) 戸根木尚子, 瀬戸淑子, 豊島滋: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究. 6. ウイルス感染細胞における蛋白質及び核酸合成に対するAntivirinの作用. *Chemotherapy* 17, 966~969, 1969

## STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY

The Nature of Antivirin, especially its Resistance against Heating and  
Proteolytic Enzyme-digestion

YOSHIKO SETO, HISAKO TONEGI and SHIGESHI TOYOSHIMA  
Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute,  
Keio Gijuku University

A highly sensitive Antivirin testing system was obtained by measuring the intracellular viral amounts in treated and control cultures at 4 and 6 hours after infection. The resistance against heating and proteolytic enzyme-digestion was confirmed to be a characteristic of Antivirin.

From the experiments of Gel-filtration using Sephadex G-200, the three active molecules, over  $30 \times 10^4$ ,  $10-11 \times 10^4$  and  $4-5 \times 10^4$  in molecular weight, of Antivirin were found. 62% Ammonium sulfate-saturated fraction also was  $4.4 \times 10^4$  in molecular weight, and then it was not inactivated by heating and trypsin-digestion. When Antivirin was filtered on the column of Sephadex G-200 after trypsin-digestion, the total activity of Antivirin was remained, while any of the three active molecules described above was not detected.

From these results, it may be suggested that Antivirin is about  $5 \times 10^4$  in molecular weight in the native status, but the active element is smaller one.